

# **Einfluss von Androgenen auf testikuläre Makrophagen unter normalen und inflammatorischen Bedingungen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs der Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jan-Per Wenzel  
aus Hamburg

Gießen, 2017

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie (Leiter: Prof. Dr. rer. physiol. A. Meinhardt)  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Direktorin: Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Meinhardt/ Dr. Monika Fijak

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Neumann

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Florian Wagenlehner

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. Claus Wittekindt

Tag der Disputation: Montag, 04.12.2017

Meinen Eltern,  
Ute & Michael

&

Meiner Frau,  
Ulla-Lotte



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Das männliche Reproduktionssystem.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Grundlagen und Struktur des Hodens .....</b>	<b>3</b>
2.2.1. Das tubuläre Kompartiment .....	4
2.2.2. Das interstitielle Kompartiment .....	5
<b>2.3. Das Immunprivileg des Hodens .....</b>	<b>6</b>
2.3.1. Die Blut-Hoden-Schranke .....	6
2.3.2. Somatische und Immun-Zellen des Hodens.....	7
<b>2.4. Testikuläre Makrophagen .....</b>	<b>10</b>
2.4.1. Merkmale testikulärer Makrophagen .....	10
2.4.2. Testikuläre Makrophagen und ihre Immunfunktion .....	12
2.4.3. Kostimulatorische Moleküle testikulärer Makrophagen .....	13
<b>2.5. Zytokine im Hoden .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6. Männliche Infertilität.....</b>	<b>15</b>
<b>2.7. Androgene .....</b>	<b>16</b>
2.7.1. Der Androgen Rezeptor (AR) .....	17
2.7.2. Der klassische Signalweg des Testosterons .....	17
2.7.3. Nicht-klassische Signalwege von Testosteron .....	19
2.7.4. Die immunsupprimierende Rolle von Testosteron .....	20
<b>2.8. Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>22</b>
<b>3. Materialien.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Chemikalien .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Zellkultur: Medien und Antibiotika .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3. Zellkultur: Nutzmittel.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4. Enzyme .....</b>	<b>26</b>
<b>3.5. Antikörper für Western Blot (*WB) und Immunfluoreszenz (**IF) .....</b>	<b>27</b>
<b>3.6. Versuchstiere.....</b>	<b>28</b>
<b>3.7. PCR und RT-PCR .....</b>	<b>28</b>
<b>3.8. Materialien für die Immunfluoreszenz.....</b>	<b>30</b>
<b>3.9. Immunoblot Materialien.....</b>	<b>31</b>
<b>3.10. Materialien für intrazelluläre Calcium Messungen .....</b>	<b>31</b>
<b>3.11. Geräte und Software .....</b>	<b>31</b>
<b>3.12. Puffer, Lösungen und Gele für biochemische Experimente .....</b>	<b>33</b>

<b>3.13. Puffer und Lösungen für Zellkultur .....</b>	<b>36</b>
<b>4. Methoden .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1. Umgang mit den Versuchstieren .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2. Isolierung von testikulären Makrophagen .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3. Behandlung von testikulären Makrophagen.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4. Isolierung von Sertoli und peritubulären Zellen .....</b>	<b>39</b>
4.4.1. Spezifische Schritte während der Isolierung von peritubulären Zellen .....	40
4.4.2. Spezifische Schritte zur Isolierung von Sertoli Zellen.....	41
<b>4.5. Isolierung von Leydig Zellen .....</b>	<b>43</b>
<b>4.6. Anfertigung von Kryostatschnitten aus den Rattenhoden .....</b>	<b>43</b>
<b>4.7. Bestimmung der Zellzahl .....</b>	<b>44</b>
<b>4.8. Immunoblot Verfahren .....</b>	<b>44</b>
4.8.1. Probengewinnung.....	44
4.8.2. Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	45
4.8.3. Semi-dry Blotting Verfahren.....	45
4.8.4. Immunoblot Analyse .....	45
4.8.5. Stripping der Immunoblot Membran .....	46
4.8.6. Immunoblot Quantifizierung.....	46
<b>4.9. Immunfluoreszenz .....</b>	<b>46</b>
4.9.1. Immunfluoreszenzfärbung der isolierten testikulären Zellen und kryokonservierten Hodenschnitte.....	46
<b>4.10. Polymerase Kettenreaktion .....</b>	<b>47</b>
4.10.1. Umgang mit RNA .....	47
4.10.2. RNA-Isolierung aus testikulären Makrophagen.....	47
4.10.3. Messung der RNA Konzentration .....	48
4.10.4. Reverse Transkription .....	48
4.10.5. Polymerase Kettenreaktion .....	49
4.10.6. DNA Agarose Gel Elektrophorese .....	50
<b>4.11. Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) .....</b>	<b>51</b>
4.11.1. Berechnung der relativen Expression gesuchter Zielgene .....	53
4.11.2. Durchführung einer Verdünnungsreihe zur Kalkulation der Primereffizienz.....	54
<b>4.12. Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsmessung.....</b>	<b>54</b>
4.12.1. Vorbereitung der Zellen zur intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationsmessung.....	54
4.12.2. Bilder und Analyse mit dem Tillvision Kamera und Software System .....	54
<b>4.13. Experimentelle Autoimmun-Orchitis (EAO).....</b>	<b>55</b>
<b>4.14. Statistische Analyse .....</b>	<b>55</b>

<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>56</b>
<b>5.1. Reinheitsbestimmung der isolierten testikulären Makrophagen.....</b>	<b>56</b>
<b>5.2. Der Androgen Rezeptor konnte nicht in testikulären Makrophagen nachgewiesen werden .....</b>	<b>58</b>
5.2.1. Untersuchung der Androgen Rezeptor-Expression mittels Immunfluoreszenz.....	59
5.2.2. Untersuchung der Androgen Rezeptor-Expression mittels Immunoblot .....	62
5.2.3. Untersuchung mittels PCR .....	64
<b>5.3. Eine Stimulation von testikulären Makrophagen mit Testosteron bewirkt keine Induktion der Phosphorylierung von ERK und CREB.....</b>	<b>65</b>
<b>5.4. Eine Stimulation von testikulären Makrophagen mit Testosteron bewirkt keinen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration.....</b>	<b>68</b>
<b>5.5. Behandlung testikulärer Makrophagen mit LPS und Testosteron .....</b>	<b>70</b>
5.5.1. Effizienzbestimmung der eingesetzten Primer für qRT-PCR.....	70
5.5.2. Die Vorbehandlung mit Testosteron hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von CD80, CD86, MCP-1, IL-6 und IL-10 nach Stimulation mit LPS in testikulären Makrophagen.....	74
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>80</b>
6.1. Der AR in testikulären Makrophagen .....	80
6.2. Der nicht-klassische Kinasen-Signalweg in testikulären Makrophagen .....	82
6.3. Der nicht-klassische $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg in testikulären Makrophagen.....	84
6.4. Testosteron hat keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Expression proinflammatorischer Moleküle in testikulären Makrophagen .....	85
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>
7.1. Zusammenfassung .....	91
7.2. Summary .....	93
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>120</b>
9.1. Publikationsverzeichnis .....	120
9.2. Ehrenwörtliche Erklärung .....	121
9.3. Danksagung.....	122
9.4. Lebenslauf Jan-Per Wenzel .....	123

## 1. Abkürzungsverzeichnis

3bHSD	3-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
AP-1	Activator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgen Rezeptor
ARE	Androgen Response Element
ATP	Adenosintri-phosphat
Bp	Base pairs (Basenpaare)
BMM	Bone-Marrow derived Macrophages
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CCL2	CC-Chemokin Ligand 2
CD80	Cluster of Differentiation 80
CD86	Cluster of Differentiation 86
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
Dest. H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
d. h.	das heißt
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EO	Experimentelle Autoimmun-Orchitis
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
p-ERK	Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase



et al.	und andere
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FKS	Fetales Kälberserum
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
g	Gramm
G	Gauge
h	hour(s) (Stunde)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IL	Interleukin
IF	Immunfluoreszenz
IκBα	Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B Cells Inhibitor, alpha
InsI3	Insulin like 3
kV	Kilovolt
l	Liter
LC	Leydig Zelle
LH	Luteinisierendes Hormon
LHR	Luteinizing Hormone Receptor
LPS	Lipopolysaccharid
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
mA	Milliampere
MAP	Mitogen-Activated Protein
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MEM	Minimum Essential Medium
Min.	Minute
ml	Milliliter
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain Enhancer of Activated B-cells
nm	Nanometer

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Ketten Reaktion)
PGK-1	Phosphoglyceratkinase-1
PTC	Peritubuläre(r/n) Zellen
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
SC	Sertoli Zellen
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standard Error of the Mean
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll Like Receptor
TM	Testikuläre(r/n) Makrophagen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
T <sub>Reg</sub>	Regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
u. a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
V	Volt
WB	Western Blot
z. B.	zum Beispiel

---

## 2. Einleitung

---

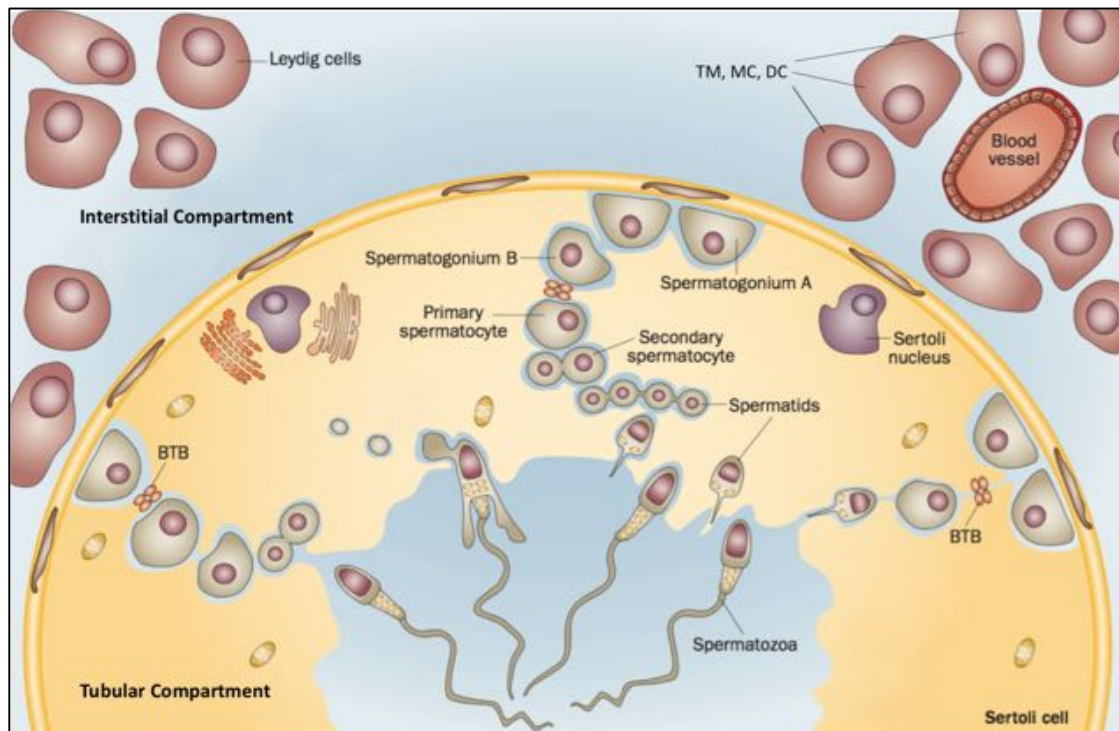
### 2.1. Das männliche Reproduktionssystem

Das männliche Reproduktionssystem der Säugetiere erfüllt zwei Aufgaben: (1) die Produktion männlicher Gameten (Spermatogenese) einschließlich der Überführung dieser in den weiblichen Reproduktionstrakt (Kretser et al. 1998); (2) die Produktion von Androgenen als männliches Steroidhormon (Steroidogenese). Die Durchführung dieser beiden Aufgaben und somit die Gewährleistung der männlichen Fertilität wird nur durch das ausgewogene Zusammenspiel der verschiedenen Organe gesichert. Anatomisch gehören hierzu der Penis, die paarig angelegten Hoden mit Nebenhoden (Epididymis) sowie die akzessorischen Geschlechtsdrüsen mit den Ausführungsgängen (Knorr et al. 1970). Die Produktion von Androgenen, mit Testosteron als primärem Derivat, als auch der Spermien findet in den Hoden statt (Behre 2013). Die in die Tubuli seminiferi contorti freigesetzten Spermatozoen wandern vom Rete testis über die Ductuli efferentes zum Nebenhoden, wo sie gespeichert werden und einen Reifungsprozess durchlaufen. Eingebettet in das Sekret der Prostata, der Bläschendrüse, welche den Hauptteil des Seminalplasmas produziert, und der Bulbourethraldrüse (Cowpersche Drüse) erlangen sie die Fähigkeit zur Fertilisation der weiblichen Eizelle (Clermont 1963).

### 2.2. Grundlagen und Struktur des Hodens

Der paarig angelegte Hoden ist von einer bindegewebigen Kapsel, der Tunica albuginea, umgeben und besteht aus 250-350 Lobuli testis (Läppchen), die beim Menschen wiederum durch radiär verlaufende, bindegewebige Septen (Septula testis) unterteilt werden (Behre 2013; Krause et al. 2011). Jeder Lobulus enthält zwei bis vier schlaufenförmig gewundene Kanälchen (Tubuli seminiferi contorti) als Ort der Spermatogenese. Bei Nagern hingegen befinden sich die Tubuli seminiferi ohne eine Septierung frei umgeben von interstitiellem Bindegewebe (Fawcett et al. 1973). Die Gesamtheit der Tubuli seminiferi mündet in das am dorsalen Hoden gelegene Rete testis, welches über acht bis zwölf Ductuli efferentes den Übergang zum Nebenhoden darstellt (Wistuba 2003).

Der Hoden lässt sich strukturell in zwei Anteile gliedern: das tubuläre Kompartiment, in dem die Spermatogenese abläuft, und das interstitielle Kompartiment, in dem sich die Steroidhormon-produzierenden Leydig Zellen (LC) und Immunzellen befinden.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der strukturellen Kompartimente des Hodens.** Den zwei strukturell unterschiedlichen Hodenkompartimenten lassen sich zwei Funktionen zuteilen: 1.) In den Tubuli seminiferi findet die Spermatogenese statt. Sie bestehen aus den Keimzellen in verschiedenen Stadien der Entwicklung (Spermatogonium A, Spermatogonium B, primären Spermatozyten, sekundären Spermatozyten, Spermatis) und den die Blut-Hoden Schranke (BTB) bildenden Sertoli Zellen (SC). 2.) Die Produktion von Testosteron (Steroidogenese) findet im interstitiellen Kompartiment in Leydig Zellen (LC), dem hier am häufigsten vorkommenden Zelltyp, statt. Neben LC sind hier ebenfalls testikuläre Makrophagen (TM), Mastzellen (MC), dendritische Zellen (DC), Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenfasern zu finden. Abdruck nach freundlicher Genehmigung von Macmilan Publishers Ltd: Nature Reviews Urology (Rato et al. 2012), Copyright 2012.

### 2.2.1. Das tubuläre Kompartiment

60-80% des Gesamtvolumens des Hodens entfallen auf die Tubuli seminiferi contorti (Krause et al. 2011). Sie werden von einer Lamina propria umgeben, die je nach Spezies aus einer oder mehreren Lagen von Myofibroblasten, den sogenannten peritubulären Zellen (PTC), und kollagenhaltigen Fasern besteht (Ailenberg et al. 1990). PTC erfüllen zum einen strukturelle Aufgaben als semipermeable Barriere und spielen zum anderen durch ihre kontraktilen Eigenschaften, vermittelt durch verschiedene Mediatoren, wie Oxytocin, Prostaglandine, Stickstoffmonoxid/zyklisches Guanosinmonophosphat (NO/cGMP), eine wichtige Rolle bei dem Transport von Spermatozoen in den Nebenhoden (Dym & Fawcett 1970; Filippini et al. 1993; Davidoff et al. 1997).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass einige Komponenten der Extrazellulärmatrix (Proteoglykane, Fibronectin, Kollagen Typ I und IV) und Wachstumsfaktoren (PModS, TGF $\beta$ , IGF-I, Activin-A), die u. a. die Sertoli-Zell(SC)-Funktion beeinflussen, von PTC produziert werden (Ailenberg et al. 1990; Maekawa et al. 1996; Albrecht 2009). Des Weiteren konnte 1989 das Vorkommen des Androgen Rezeptors (AR) in PTC nachgewiesen werden (Anthony Kovacs, W.J. & Skinner 1989). Darüber hinaus zeigte Scott et al., dass die Androgenwirkung in PTC die indirekt juvenile SC Proliferation beeinflussen kann (Scott et al. 2007).

Durch eine Basallamina wird die Lamina propria von dem aus Keimzellen und SC zusammengesetzten Keimepithel abgegrenzt (Meniru 2014). Die hochprismatischen SC erstrecken sich von der Basallamina, wo sie durch tight und gap junctions miteinander verbunden sind, bis zum apikalen Lumen des Tubulus und bilden mittels spezifischer Junktionen die Blut-Hoden-Schranke (Pelletier & Byers 1992; Li et al. 2012). Die Blut-Hoden-Schranke kompartimentiert die Tubuli, sodass eine Versorgung der haploiden Keimzellen mittels Sekretion und selektiven Transports von notwendigen Wachstumsfaktoren und Nährstoffen durch die SC gewährleistet wird (Griswold 1998). SC werden über Androgene reguliert und phagozytieren bei der Spermatogenese entstehende Residualkörper (Zhou et al. 2002; Krause et al. 2011). Die zwischen den SC gelegenen Keimzellen lassen sich von adluminal nach luminal folgenden Entwicklungsstufen zuordnen: Spermatozyte I. Ordnung, Spermatozyte II. Ordnung, Spermatiden und Spermatozoen (Clermont 1963; Kretser et al. 1998).

### **2.2.2. Das interstitielle Kompartiment**

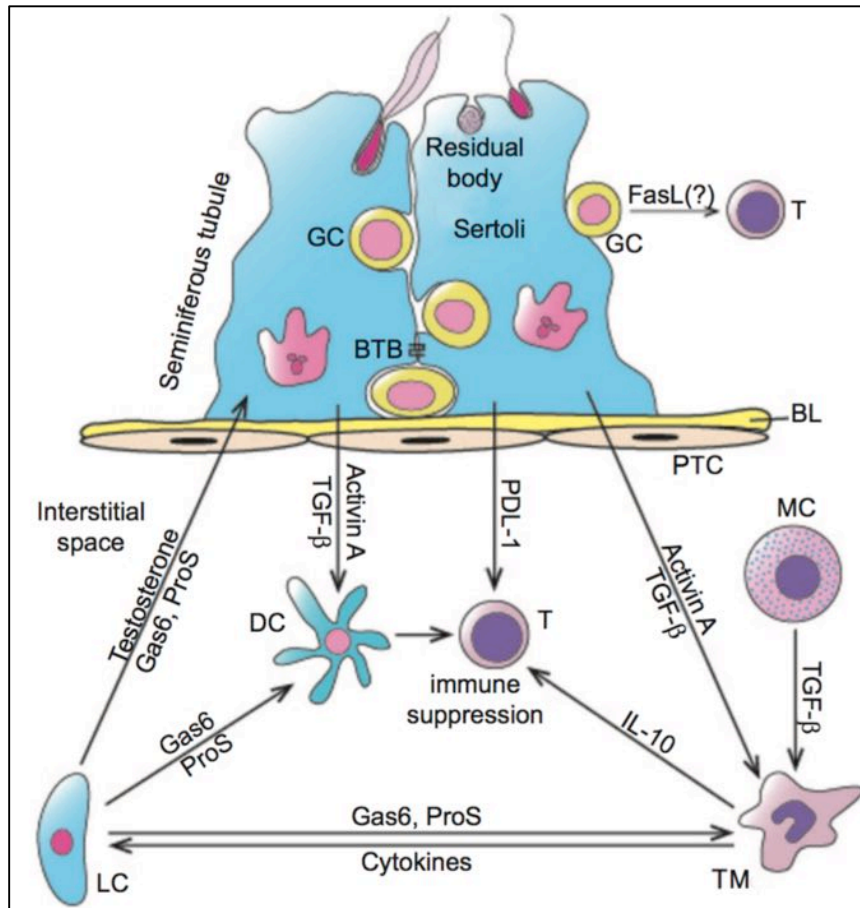
Zwischen den Tubuli seminiferi contorti befindet sich das interstitielle Kompartiment. Hier finden sich neben testikulären Makrophagen (TM), dendritischen Zellen (DC), T-Zellen, Mastzellen (MC), Fibrozyten, Lymph- und Blutgefäßen, Bindegewebe und Nervenfasern, die Testosteron produzierenden LC (Niemi et al. 1986; Kerr et al. 1985; Haider 1988). Sie stellen den endokrinen Anteil des Hodens dar und sind so zahlreich, dass sie beim Menschen 10-12 % des gesamten Hodenvolumens ausmachen, bei der Ratte jedoch lediglich 3% (Mori & Christensen 1980; Haider 2004). Die Hauptaufgaben des in den LC produzierten Testosterons für die Hodenfunktion sind die Initiierung, Aufrechterhaltung und Regulation der Spermatogenese (Hardy et al. 1989).

## 2.3. Das Immunprivileg des Hodens

Der Hoden zählt, wie auch die vordere Augenkammer Auge, die Plazenta und das Gehirn, zu den immunprivilegierten Organen. Hier werden Xeno-, Allo- und Auto-Antigene toleriert, ohne dass es zu einer inflammatorischen Reaktion kommt (Head et al. 1983; Head & Billingham 1985; Li et al. 2012). Zur Aufrechterhaltung des Immunprivilegs trägt überwiegend ein lokal immunsupprimiertes Milieu bei (Ferguson & Scothorne 1977; Setchell 1990; Zhao et al. 2014). Paradoxerweise besitzt der Hoden die Fähigkeit zur akuten Inflammation (Orchitis) als Reaktion auf die Exposition gegenüber pathogenen Erregern wie den uropathogenen *Escherichia coli* (Wiles et al. 2009; Bhushan et al. 2008). Das Immunprivileg bedeutet folglich nicht die Abwesenheit von Entzündungsreaktionen, sondern vielmehr die intensive Kontrolle inflammatorischer Abläufe zur Gewährleistung einer geschützten Umgebung der sensiblen Gameten (Meinhardt & Schuppe 2003).

### 2.3.1. Die Blut-Hoden-Schranke

Die Blut-Hoden-Schranke, ein Komplex aus den basal gelegenen tight junctions, gap junctions und Macula adhaerens zwischen benachbarten SC, bewirkt eine molekulare Barriere und damit funktionelle Trennung der adluminal der Schranke in den Tubuli sitzenden Keimzellen von den interstitiellen Immunzellen (Dym & Fawcett 1970; Mital et al. 2011). Unterstützt wird die Barrierefunktion durch die den Tubulus umgebende Basallamina und die PTC, die als zusätzliche semi-permeable Schranke fungieren (Pelletier & Byers 1992). Somit begrenzt die Blut-Hoden-Schranke den Zugang des Immunsystems zum adluminalen Teil des Tubulus und den sich dort befindenden autoantigenen haploiden Keimzellen (Zhao et al. 2014). Ursprünglich war man der Überzeugung, dass die Antigen-spezifischen Immunreaktionen im Hoden primär durch die immunologische Abriegelung der Blut-Hoden-Schranke bedingt seien (Dym & Fawcett 1970). Inzwischen ist jedoch klar, dass die Funktion der Blut-Hoden-Schranke in der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs gering ist, u. a. da Auto-Antigene reguliert durch die SC ins Interstitium transportiert werden (Terayama et al. 2014; Tung et al. 2017). Es sind vielmehr andere zelluläre und humorale Mechanismen, die primär für das Immunprivileg verantwortlich und in Abbildung 2 schematisch zusammengefasst sind.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der am Immunprivileg beteiligten Faktoren.** Die Aktivierung von Immunzellen wird durch eine Vielzahl immunsuppressiver Faktoren, wie Testosteron, Gas6, Activin A, PDL-1, TGF- $\beta$  und Pro S, die von LC und SC ausgeschüttet werden, unterdrückt. Testikuläre dendritische Zellen (DC) besitzen unter physiologischen Bedingungen nicht die Fähigkeit der Aktivierung von T-Zellen. Sowohl TM als auch Mastzellen (MC) tragen mittels der Produktion antiinflammatorischer Zytokine (u. a. TGF- $\beta$  und IL-10) ebenfalls zur Immunsupprimierung bei. Über eine Induktion der T-Zell Apoptose durch FasL herrscht bis dato noch keine Klarheit. BTB = Blood Testis Barrier (Blut-Hoden-Schranke), DC = dendritische Zelle, FasL = Fas Ligand, Gas6 = Growth arrest-specific gene 6, GC = Germ Cell (Keimzelle), LC = Leydig Zelle, MC = Mastzelle, PTC = Peritubuläre Zelle, TM = testikuläre Makrophage, PDL-1 = Programmed Death Ligand 1, ProS = Protein S, SC = Sertoli Zelle, TGF- $\beta$  = Transforming Growth Factor- $\beta$ . Abdruck nach freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Cellular & Molecular Immunology (Zhao et al. 2014), Copyright 2014.

### 2.3.2. Somatische und Immun-Zellen des Hodens

Im Folgenden soll auf die einzelnen involvierten Zelltypen und explizit deren Rolle für das Immunprivileg des Hodens eingegangen werden. Die Funktionen und Aufgaben von TM, die ebenfalls hierzu zählen, werden im nachstehenden Kapitel separat behandelt.

#### Sertoli Zellen (SC)

SC besitzen neben den bereits unter 2.2.1. beschriebenen Aufgaben nennenswerte immunsuppressive Eigenschaften. Bereits vor knapp 30 Jahren wurde der

hemmende Einfluss von SC auf die Immunantwort von Lymphozyten über die Sekretion von SCPs (Sertoli Cell Protein) nachgewiesen (Wyatt et al. 1988; De Cesaris et al. 1992). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass kotransplantierte SC eine immunprotektive Wirkung gegenüber Nieren- und Pankreas-Inselzell-Transplantaten bei Mäusen aufweisen (Selawry & Cameron 1993; Suarez-Pinzon et al. 2000) und den immunsuppressiven Fas Liganden sekretieren (De Cesaris et al. 1992). Zugleich produzieren SC die Zytokine Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), das Chemokin Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) sowie eine Vielzahl immunsuppressiver Faktoren wie Gas6, Activin A, PDL-1 und Pro S (Gerard et al. 1991; Riccioli et al. 1995; Chan et al. 2000; Kazutaka et al. 2011; Zhao et al. 2014). Diese üben eine duale Funktion aus. Unter physiologischen Bedingungen werden sie in geringen Mengen ausgeschüttet und gewährleisten eine normale Spermatogenese (Pollanen et al. 1989; Soder et al. 1991; Hakovirta et al. 1995; Potashnik et al. 2005). Unter inflammatorischen Bedingungen hingegen werden sie in größeren Mengen synthetisiert und können dabei durch ihre entzündungsstimulierende Rolle die Spermatogenese negativ beeinflussen (Syed et al. 1993; Stéphan et al. 1997).

### **Peritubuläre Zellen (PTC)**

PTC weisen eine Vielzahl an strukturellen und sekretorischen Eigenschaften auf, von denen einige bereits unter 2.2.1 erörtert wurden. Ferner üben PTC ihren immunmodulierenden Einfluss über die Fähigkeit zur Synthese und Ausschüttung von Nerve Growth Factor (NGF), MCP-1 und weiteren inflammatorischen Molekülen wie IL-6 und Zyklooxygenase-2 (COX-2), zusätzlich zur Expression von TNF- $\alpha$  Rezeptoren 1 und 2 aus (Schell et al. 2008; Albrecht 2009).

### **Leydig Zellen (LC)**

LC medieren nicht nur einen antiinflammatorischen Einfluss durch die Produktion von Androgenen, sondern besitzen darüber hinaus die Fähigkeit, Immunantworten durch die Regulation der Anzahl von Lymphozyten und TM zu modulieren (Raburn et al. 1993). Dejucq und Melaine beschreiben eine antivirale Funktion von LC nach viraler Infektion (Dejucq et al. 1997; Melaine et al. 2003). Überdies stellt höchstwahrscheinlich die immunsupprimierende Eigenschaft der durch LC produzierten Androgene einen wesentlichen Beitrag zum verminderten Auftreten von Autoimmunerkrankungen beim männlichen im Vergleich zum weiblichen Geschlecht dar (Nussinovitch & Shoenfeld 2012).



### **Keimzellen**

**Keimzellen** produzieren diverse Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$ , die einen Einfluss auf die Immunantwort im Hoden ausüben (De et al. 1993; Haugen et al. 1994). Der an der Apoptose beteiligte Fas Ligand (FasL) wird in Keimzellen in großer Menge exprimiert, jedoch konnte bis dato nicht geklärt werden, ob dieser Mechanismus zum Immunprivileg des Hodens beiträgt (D'Alessio et al. 2001; Zhao et al. 2014).

### **Mastzellen (MC)**

Im Hoden nimmt Anzahl an **MC** im Laufe einer Hodenentzündung bei der Ratte um mehr als das 10-Fache zu (Iosub et al. 2006). Männliche Infertilität auf Grund einer Störung der Spermatogenese ist mit einer Zunahme an MC assoziiert (Hussein et al. 2005). Darüber hinaus sind MC, höchstwahrscheinlich mittels der Produktion von TGF- $\beta$ , entscheidende Mediatoren für die durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (T<sub>Reg</sub>) vermittelte Toleranz gegenüber Allograften (Lu et al. 2006). Die Sekretion der Serin Protease Trypsin durch MC im Rattenmodell der experimentellen Autoimmun-Orchitis (EAO) führt zur Induktion der Expression von TGF- $\beta$ 2, MCP-1 und COX-2 in PTC mittels Adressierung des Protease-aktivierten Rezeptors-2 (PAR2) und verursacht darüber hinaus eine Fibrose der Wand der Tubuli seminiferi (Frongieri et al. 2002; Iosub et al. 2006).

### **Lymphozyten**

**Lymphozyten** finden sich sowohl unter inflammatorischen als auch unter physiologischen Bedingungen im interstitiellen Kompartiment des Hodens. Hierbei handelt es sich vorwiegend um CD8<sup>+</sup> Zellen, wobei ebenfalls CD4<sup>+</sup> Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und T<sub>Reg</sub>-Zellen anzufinden sind. B-Lymphozyten hingegen sind bisher noch nicht nachgewiesen worden. Im Verlauf der EAO steigt die Anzahl an Lymphozyten, vor allem T-Zellen, signifikant an (el-Demiry et al. 1987; Lustig et al. 1993; Jacobo et al. 2009). Die immunsuppressiven T<sub>Reg</sub>-Zellen vermitteln des Weiteren die Immuntoleranz gegenüber Keimzell-Antigenen in vasektomierten Mäusen (Wheeler et al. 2011).

### **Dendritische Zellen (DC)**

**DC** kommen in sehr kleiner Zahl im Interstitium vor und scheinen in der testikulären Autoimmunantwort involviert zu sein (Guazzone et al. 2011; Rival et al. 2007). DC präsentieren Autoantigene gegenüber T-Lymphozyten und sind folglich fähig zur Aktivierung von T- und B-Lymphozyten (Banchereau & Steinman 1998;

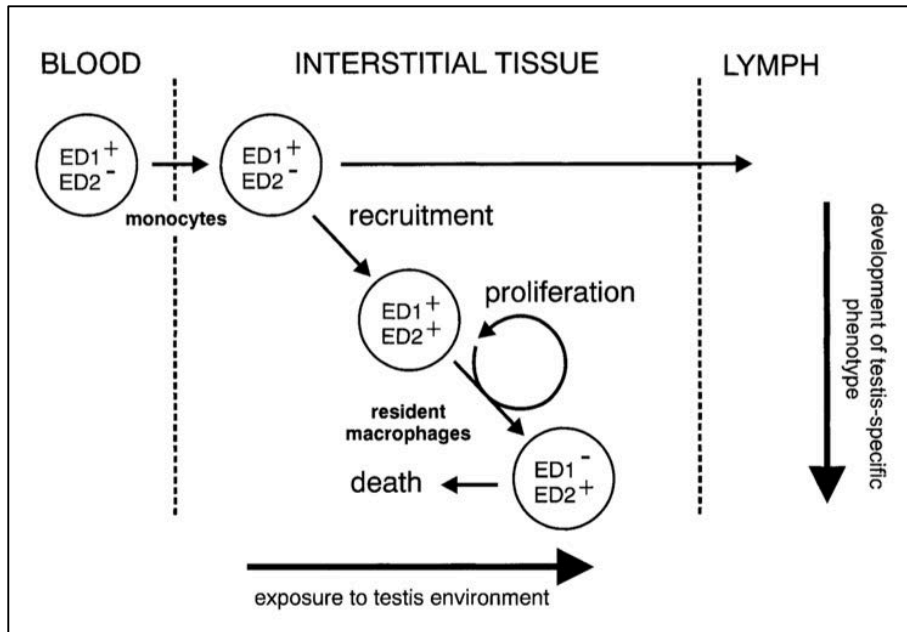
Millar et al. 2003). Ihre Anzahl steigt, wie auch die der Mastzellen und Lymphozyten, signifikant in der EAO an (Rival et al. 2006).

## **2.4. Testikuläre Makrophagen**

TM zählen neben LC zu den am häufigsten vorkommenden Zellen im Interstitium und repräsentieren unter physiologischen Bedingungen 15-20% der interstitiellen Zellpopulation (Hedger 2002). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von LC sowie der Steroidogenese und weisen protektive Eigenschaften gegenüber den neu entstehenden Gameten auf (Sun et al. 1993; Hutson 2006). Durch ihre Fähigkeit nicht nur zur Induktion, sondern auch zur Suppression inflammatorischer Antworten auf Infektionen sind sie integral für den Erhalt des testikulären Immunprivilegs (Kern et al. 1995).

### **2.4.1. Merkmale testikulärer Makrophagen**

TM sind morphologisch nicht unterscheidbar von Makrophagen anderer Gewebe und exprimieren entsprechende Marker (Hutson 1994). Anhand der Expression des lysosomalen Glykoprotein CD68 (ED1<sup>+</sup>) und des Scavenger-Rezeptors CD163 (ED2<sup>-</sup>) lassen sich TM im Rattenhoden in mehrere Subpopulationen unterteilen (Wang et al. 1994). Es lässt sich eine Entwicklung von Monozyten beobachten, die in den Hoden als ED1<sup>+</sup>/ED2<sup>-</sup> einwanderten, innerhalb weniger Tage eine ED2<sup>+</sup>-Immunreaktion zeigten, daraufhin die komplette ED1-Expression verloren und folglich zu ED1<sup>-</sup>/ED2<sup>+</sup> residenten Makrophagen wurden (siehe Abbildung 3) (Hedger 2002).



**Abbildung 3: Entwicklungsprozess testikulärer Makrophagen im Hoden.**  $ED1^+$  Monozyten wandern in das interstitielle Kompartiment des Hodens über die Blutgefäße ein. Einige Monozyten verlassen diesen wieder direkt, während andere zur Population der residenten Makrophagen rekrutiert werden. Diese beginnen daraufhin, den  $ED2^+$  Marker auf ihrer Oberflächenmembran zu exprimieren und graduierlich den Monozyten Marker  $ED1^+$  zu verlieren, sodass die distinkten  $ED1^-/ED2^+$  residenten Makrophagen im Hoden entstehen. Abdruck nach freundlicher Genehmigung von Elsevier: Journal of Reproductive Immunology (Hedger 2002), Copyright 2002.

Ähnliche Beobachtungen bezüglich der organspezifischen Entwicklung eingewanderter Monozyten wurden auch in anderen Geweben gemacht (Jäger et al. 1993; Sakanashi et al. 1994; McLennan 1996). Den Hauptteil mit ca. 80% stellen die residenten  $ED1^-/ED2^+$  Makrophagen dar, ca. 20% machen die zirkulierenden Monozyten und  $ED1^+/ED2^+$  Makrophagen aus. Haben Monozyten sich zu residenten  $ED1^-/ED2^+$  Makrophagen entwickelt, verlassen sie den Hoden nicht mehr bis zu ihrem Zelluntergang (Russell & Lindenbaum 1979). Die TM Population wird durch die Balance zwischen Rekrutierung, Proliferation mittels Mitose (Schlatt et al. 1999) und Tod von Monozyten aufrechterhalten (Raburn et al. 1993). Die Rekrutierung der TM läuft unter der Kontrolle von LC ab, was sich darin zeigt, dass während der Hodenentwicklung dem numerischen Anstieg von LC unmittelbar der Anstieg der Anzahl an Makrophagen folgt (Hardy et al. 1989; Raburn et al. 1993; Ariyaratne & Chamindrani Mendis-Handagama 2000). Im Umkehrschluss führt die experimentelle zytotoxische Depletion von LC zu einer signifikanten Abnahme an TM (Wang et al. 1994). Verschiedene Studien legen jedoch nahe, dass der Einfluss von LC auf TM nicht Androgen vermittelt abläuft, sodass der genaue Mechanismus bis heute unerforscht bleibt (Duckett et al. 1997).

Eine weitere Klassifikation unterscheidet proinflammatorische M1- (zirkulierende Makrophagen) von antiinflammatorischen M2-Makrophagen (residente Makrophagen) (Mosser & Edwards 2008; Martinez et al. 2009). Durch die Stimulation mit Mediatoren wie IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$  und Glukokortikoiden transformieren M1- zu den M2-Makrophagen, die durch die Expression von CD163 charakterisiert (Martinez et al. 2009; Wang et al. 2017).

#### **2.4.2. Testikuläre Makrophagen und ihre Immunfunktion**

TM unterscheiden sich von anderen Makrophagen durch ihre stark ausgeprägten antiinflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften (Kern et al. 1995).

TM gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen und exprimieren den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC: Major Histocompatibility Complex) auf ihrer Zelloberfläche (Hedger & Eddy 1987; Pöllänen & Niemi 1987; Tung et al. 1987; Wang et al. 1994). Sie besitzen die Fähigkeit, durch die Produktion von kostimulatorischen Molekülen und Zytokinen die T-Zell Antwort zur aggressiven zellvermittelten Immunität zu stimulieren oder aber zu unterdrücken (Paul & Seder 1994). Residente TM produzieren dauerhaft antiinflammatorische Zytokine sowie geringe Mengen an Kortikosteroiden und werden weniger als herkömmliche Makrophagen durch Pathogene stimuliert (Winnall et al. 2011; Bhushan et al. 2011; Wang et al. 2017). Dies äußert sich u. a. darin, dass mit LPS stimulierte TM nur 2,8% der Menge an Interleukin 1 (IL-1) von peritonealen Makrophagen produzieren (Hayes et al. 1996). Bhushan zeigte, dass TM, im Vergleich zu peritonealen Makrophagen, die NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa-Light-Chain Enhancer of Activated B-Cells) Aktivierung durch die Unterdrückung der I $\kappa$ B $\alpha$  (Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B Cells Inhibitor, alpha) Ubiquitinierung und einer generellen Reduktion der Toll Like Receptor (TLR) Signaltransduktion inhibieren (Bhushan et al. 2015). Somit tragen sie zur Aufrechterhaltung des Immunprivilegs bei. Zu den von TM synthetisierten immunsuppressiven Peptiden gehören  $\beta$ -Endorphin und  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon ( $\alpha$ -MSH) (He et al. 1991). Im Gegensatz dazu zeigten bereits vor mehr als 20 Jahren Moore und Hutson (Moore & Hutson 1994) und kurze Zeit später Kern und Maddocks (Kern & Maddocks 1995), dass isolierte TM nur in geringem Maße die Fähigkeit zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , besitzen. Hinzu kommt, dass residente TM den inflammatorischen Marker iNOS (induzierbare NO-Synthase) nicht exprimieren (O'Bryan, Schlatt, Gerdprasert, et

al. 2000). Die Produktion von Prostaglandinen und anderen Zytokinen, wie dem Monozytenkolonien-stimulierenden Faktor (M-CSF: Makrophage Colony-Stimulating Factor), ist jedoch nicht eingeschränkt (Kern et al. 1995).

Trotz der vor allem immunsuppressiven Eigenschaften von TM ist der Hoden fähig, eine Entzündungsreaktion zu induzieren. Orchitiden verändern gravierend die Zusammensetzung der Population von TM (O'Bryan, Schlatt, Phillips, et al. 2000). Zirkulierende Monozyten infiltrieren nur 12 h nach Behandlung mit Lipopolysacchariden (LPS) den Hoden und scheinen eine schädigende Wirkung auf die Spermatogenese zu entfalten (Suescun et al. 2000; Theas et al. 2008). Eine Orchitis führt zu einem Anstieg der Zahlen von Monozyten und ED1<sup>+</sup>/ED2<sup>-</sup> Makrophagen im Hoden. Diese produzieren daraufhin hohe Mengen an TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und niedrigere Level des antiinflammatorischen Zytokins TGF- $\beta$ 1 (Hales et al. 1992; Xiong & Hales 1997; Rival et al. 2008; Winnall et al. 2011).

Hedger folgert hieraus, dass TM keine beständige Population mit gleichbleibenden Funktionen und Immunantworten darstellen, sondern dass sie sich vielmehr innerhalb kurzer Zeit mittels neu rekrutierter Monozyten in eine proinflammatorische Richtung verändern, dadurch das Immunprivileg schwächen und eine unkontrollierte Entzündung vorantreiben können (Hedger 2002). Die frisch eingewanderten Monozyten entwickeln sich jedoch im Laufe der Zeit zu den residenten ED1<sup>-</sup>/ED2<sup>+</sup> TM (M2-Makrophagen), welche durch ihre antiinflammatorischen-Eigenschaften die Hodenfunktion unterstützen.

#### **2.4.3. Kostimulatorische Moleküle testikulärer Makrophagen**

**CD80** (B7-1) und **CD86** (B7-2) gehören zur Familie der Immunglobuline und sind Proteine, die auf Antigen-präsentierenden Zellen wie DC, Monozyten und TM sowie auf aktivierten B- und T-Zellen exprimiert werden (Freedman et al. 1987; M. Azuma et al. 1993; Banchereau & Steinman 1998; Davila et al. 2010). Sie agieren als Liganden für CD28 und CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4), sorgen gemeinsam für die Aktivierung und das Überleben von T-Lymphozyten und erhöhen in Folge die IL-2-Expression (Fraser et al. 1993; Lanier et al. 1995; Peach et al. 1995; Olivares et al. 1997; Bugeon & Dallman 2000; Liu et al. 2010). Während CD86 dauerhaft auf ruhenden Monozyten exprimiert wird, ist CD80 nur auf mit IFN- $\gamma$  stimulierten Monozyten vorhanden (Freedman et al. 1991; M Azuma et al. 1993). TM,

die mit *Listera monocytogenes* stimuliert werden, exprimieren höhere Mengen an CD80 und CD86 als native TM (Sonoda et al. 1997).

## 2.5. Zytokine im Hoden

Zytokine sind eine Gruppe von Steuerungs-Proteinen, die an verschiedenen Prozessen, wie dem Zellwachstum und der Zellproliferation, Immunreaktionen und Entzündungen, beteiligt sind (Lackie 2010). Sie werden vornehmlich durch Zellen der hämatopoetischen Linie synthetisiert und sind typischerweise nicht größer als 35 kDa. Sie entfalten ihre Wirkung sowohl autokrin als auch parakrin (Vilček & Thomson 1998). Die Erhaltung des testikulären Immunprivilegs wird u. a. durch das Zusammenwirken der Funktionen im Hoden produzierter Zytokine reguliert.

Zur besseren Verständlichkeit und Übersicht lassen sie sich in proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine einteilen, auch wenn dies eine Vereinfachung ihrer komplexen Funktionsmechanismen darstellt. Unter physiologischen Bedingungen werden im Hoden verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und MCP-1, exprimiert.

**TNF- $\alpha$**  wird sowohl von aktivierten TM und MC als auch von Spermatozyten, Spermatiden und SC synthetisiert und ist mit seinen zytotoxischen Eigenschaften eines der potentesten proinflammatorischen Zytokine (Xiong & Hales 1993; De et al. 1993; Moore & Hutson 1994). Unter physiologischen Bedingungen schützt es die Keimzellen vor Apoptose, höhere Konzentrationen unter inflammatorischen Bedingungen wiederum induzieren die Apoptose von Keimzellen (De Cesaris et al. 1992). Des Weiteren spielt TNF- $\alpha$  eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der EAO und unterdrückt die Androgen Synthese in LC (Mealy et al. 1990; Yule 1993).

**IL-6** wird von SC, LC und TM produziert (Boockfor et al. 1994; Okuda et al. 1995; Stéphan et al. 1997). IL-6 stellt ein Interleukin dar, das sowohl antiinflammatorische als auch proinflammatorische Reaktionen vermittelt. So stimuliert es zum einen die Hochregulierung von Akute-Phase-Proteinen, die Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> im Hypothalamus (Fieber) sowie die Produktion neutrophiler Granulozyten im Knochenmark (Banks et al. 1994; Bastard et al. 1999; Bravo & Heath 2000). Zum anderen aktiviert es T-Zellen zur Produktion antiinflammatorischer Zytokine (Tilg et al. 1997). Es wird unter akuten und chronisch entzündlichen Bedingungen vermehrt in TM exprimiert (Syed et al. 1995; Kern et al. 1995).

**MCP-1** ist ein Chemokin und wird in SC, PTC, LC und TM synthetisiert (Aubry et al. 2000). Es bewirkt eine starke Rekrutierung von Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen aus der Blutbahn, möglicherweise auch deren Retention in den entzündeten Hoden (Proost et al. 1996; Iosub et al. 2006). Unter physiologischen Bedingungen kommt es in geringen Konzentrationen im Hoden vor (Gerdprasert et al. 2002). In Modellen für chronische und akute testikuläre Entzündungen wurde eine erhöhte Expression von MCP-1 nachgewiesen (Aubry et al. 2000; Gerdprasert et al. 2002; Guazzone et al. 2003). Residente TM exprimieren deutlich schwächer MCP-1 als zirkulierende Makrophagen (Guazzone et al. 2003).

**IL-10** gehört, neben TGF- $\beta$ , zu den wichtigsten antiinflammatorischen und immunregulierenden Zytokinen und wird von T-Helferzellen, T<sub>Reg</sub>-Zellen, DC und TM produziert (Fiorentino et al. 1989; de Waal Malefyt, Abrams, et al. 1991; Paul & Seder 1994). Es vermindert die Produktion proinflammatorischer Zytokine und sowohl die Aktivierung als auch die Proliferation von T-Helferzellen über die Stimulation des JAK1/STAT3 (Janus Kinase 1/Signal Transducer and Activator of Transcription 3) Signalweges sowie der Heme Oxygenase-1 (de Waal Malefyt, Haanen, et al. 1991; Akdis et al. 2000; Lee & Chau 2002). Während ED2<sup>+</sup> residente Makrophagen sowohl unter physiologischen als auch unter inflammatorischen Bedingungen IL-10 produzieren, exprimieren ED2<sup>-</sup> zirkulierende Makrophagen kein IL-10 (Winnall et al. 2011). Die Expression von IL-10 im Hoden nimmt nach Induktion einer Entzündung mittels LPS zu. Die erhöhte IL-10-Expression verursacht durch die Verminderung der Superoxid Level einen Abfall der Expression der Xanthin Oxidase. Dies bewirkt einen Schutz der Endothelfunktion (Gunnnett et al. 2000; Winnall et al. 2011; Ozturk et al. 2014).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass TNF- $\alpha$  und IL-6 sowohl unter physiologischen als auch unter inflammatorischen Bedingungen, hier jedoch verstärkt, im Hoden synthetisiert werden, während IL-10 und MCP-1 primär unter inflammatorischen Bedingungen im Hoden exprimiert werden (Hedger & Meinhardt 2003).

## 2.6. Männliche Infertilität

In den westlichen Industrienationen ist ca. jedes siebte Paar von Infertilität betroffen (de Kretser 1997; Evers 2002; Thoma et al. 2014). Infertilität ist definiert als die

Unfähigkeit, trotz ungeschützten Geschlechtsverkehrs, innerhalb von 12 Monaten schwanger zu werden (Page 1989; Templeton et al. 1990). Ungefähr 20% aller Fälle von Infertilität sind allein durch männliche Faktoren bedingt und zusätzliche 30% sowohl durch weibliche als auch durch männliche Faktoren (Mosher & Pratt 1991; Bushnik et al. 2012). Die Ursachen für männliche Infertilität sind sehr vielfältig. Zu den wichtigsten Gründen zählen der Kryptorchismus, Varikozelen und die Nebenhoden- bzw. Ductus deferens-Aplasie, die gemeinsam bis zu 30% ausmachen. Weitere Gründe sind Chromosomenaberrationen (z. B. Klinefelter-Syndrom, XXY-Syndrom), endokrinologische Störungen (z. B. Kallmann-Syndrom, Hypophysenadenome), Erb- und Systemkrankheiten (z. B. Zystische Fibrose) sowie Antikörper gegen Spermatozoen, Zytostatika-/Radiotherapie, Drogen, Life-Style-Faktoren (Zigaretten, Alkohol, Kaffee) und Umweltfaktoren (Aafjes & van der Vijver 1985; Himmel et al. 1997; Datta et al. 2016). Infektionen und konsekutive Entzündungen des männlichen Genitaltraktes gehören ebenfalls zu den relevanten Gründen für männliche Infertilität (Hales et al. 1999; O'Bryan, Schlatt, Gerdprasert, et al. 2000). Diese können bakteriell (*Escherichia coli*, *Chlamydien*, *Enterobacter*), viral (Mumps) oder steril-autoimmun bedingt sein und einen akuten, subakuten oder chronischen Verlauf annehmen (Kretser et al. 1998). Die Entzündung des Hodens ist histopathologisch sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen durch eine vermehrte Infiltration des Interstitiums mit Makrophagen, einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine und der Bildung von Autoantikörpern, die durch Atrophie der Tubuli seminiferi und eine verminderte Androgenproduktion zu einer reduzierten Spermienanzahl bis zur Azoospermie führen, charakterisiert (Doncel et al. 1989; Lustig et al. 1993; Weidner et al. 1999; Schuppe et al. 2008; Schuppe et al. 2010).

## 2.7. Androgene

Androgene sind essenziell für die Sicherstellung der männlichen Fertilität (McLachlan et al. 2002; Scott et al. 2007). Nicht nur die Gewährleistung der Hodenfunktion und der Spermatogenese, sondern auch die Etablierung und Aufrechterhaltung des Immunprivilegs sind aller Voraussicht nach abhängig von Testosteron (Hardy et al. 1989; Chang et al. 2004; Fijak & Meinhardt 2006). Testosteron wird in LC nach Stimulation mit Luteinisierendem Hormon (LH) produziert. Testosteron agiert als autokriner und parokriner Faktor, der in die Tubuli seminiferi diffundiert. Im Vergleich



zum Level von Serumtestosteron sind die Konzentrationen im Hoden 25 bis 125 Mal höher (Walker 2011). Fällt der Testosteronspiegel im Hoden auf Level kleiner als 80% des Normwertes, sinkt die Spermienproduktion exponentiell (Zirkin et al. 1989). Der Einfluss von Testosteron auf die Entwicklung und das Überleben von Keimzellen scheint vor allem über SC abzulaufen, die ein AR exprimieren (Griswold 1998). Studien an Mäusen mit einem konditionellen AR knock-out in SC (SCARKO = Sertoli Cell Androgen Receptor Knock-out) haben gezeigt, dass beim Fehlen des AR in SC die Integrität der Blut-Hoden-Schranke verloren ging und eine funktionierende Spermatogenese nicht aufrechterhalten werden konnte (O'Donnell et al. 1996; De Gendt et al. 2004; Tsai et al. 2006).

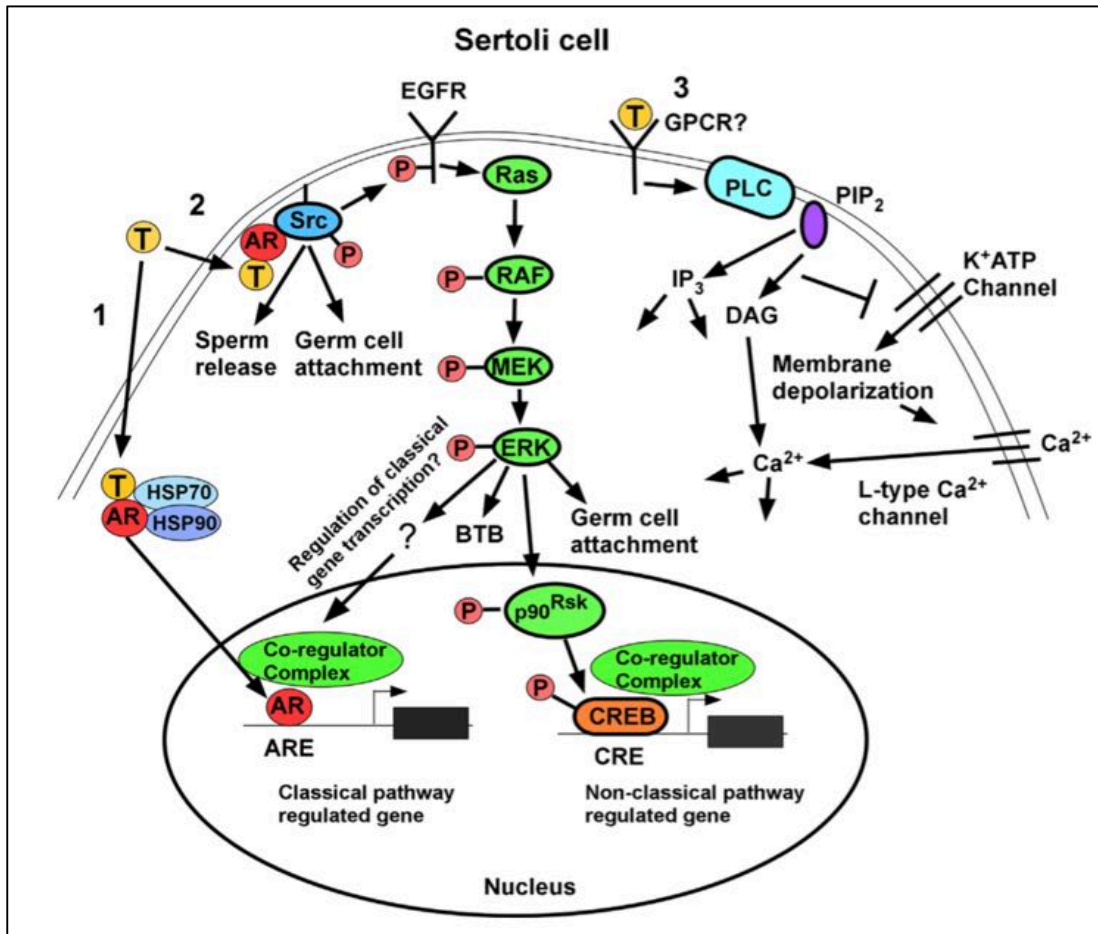
### **2.7.1. Der Androgen Rezeptor (AR)**

Der AR wird im Hoden in LC, SC, PTC, glatten Muskelzellen der Arteriolen und vaskulären Endothelzellen exprimiert (Anthony Kovacs, W.J. & Skinner 1989; Vornberger et al. 1994; Zhou et al. 2002; Wang et al. 2009; Smith & Walker 2014). Seine Anwesenheit in Keimzellen wurde lange kontrovers diskutiert (Lyon et al. 1975; Johnston et al. 2001). Der AR gehört zur Familie der Steroidhormonrezeptoren und hat eine Größe von 110 kD (Germain et al. 2006). Er besteht aus einer aminoterminalen A/B-Domäne zur Aktivierung von Zielgenen, einer Liganden-Domäne, zur Bindung von Androgenen durch Wasserstoffbrückenbindungen und durch hydrophobe Anziehungskräfte, und einer DNA-Bindungsdomäne mit zwei Zink-Finger-Motiven (Brinkmann et al. 1989; Zirkin et al. 1989; Schaufele et al. 2005). In seiner inaktiven Form findet er sich im Zytoplasma an die Hitzeschockproteine (HSP) 70 und 90 gebunden, auch Aporezeptorkomplex genannt. Die Höhe der Expression des AR ist in PTC relativ konstant, während sie in SC starken Schwankungen, abhängig vom Zyklus der Spermatogenese, unterliegt (Bremner et al. 1994). Die Bindung von Testosteron an den AR kann zur Induktion zweier verschiedener Signalkaskaden führen, die im Folgenden genauer erläutert werden.

### **2.7.2. Der klassische Signalweg des Testosterons**

Im klassischen Signalweg diffundiert freies Testosteron durch die Plasmamembran und bindet an den AR (Abbildung 4, links). Diese Bindung bewirkt eine Konformationsänderung des AR, welche die Ablösung der Hitzeschockproteine mit Rezeptor-Dimerisierung zur Folge hat. Der mit Testosteron gebundene AR transloziert anschließend in den Nukleus, bindet an Androgen Response Elemente (ARE),

spezifische Gen-regulatorische DNA Sequenzen, und mobilisiert Co-Aktivatoren und Co-Repressor Proteine zur Regulierung bestimmter Gene, wie z. B. Cytochrom P450, Cyp17-Familie, Epididymaler Peptidase Inhibitor (Eppin) und Reproductive Homeobox 5 (RhoX 5) (Burgos-Trinidad et al. 1997; Smith & Walker 2014). Die Zeit, die der klassische Signalweg nach Bindung von Testosteron an den AR benötigt, um eine funktionelle Antwort auszulösen, beträgt mindestens 30-45 Minuten (Shang et al. 2002).



**Abbildung 4: Schematische Übersicht der verschiedenen Testosteron-Signalwege.** Aktuell sind drei verschiedene Testosteron-Signalwege bekannt. 1.) Der klassische Testosteron-Signalweg: Nachdem Testosteron durch die Plasmamembran diffundiert ist, bindet es an den intrazellulären AR, welcher durch eine Konformationsänderung von Hitzeschockproteinen (HSP70 und HSP90) gelöst wird und so in den Nukleus transfundieren kann, um an spezifische Androgen Response Elemente (ARE) zu binden. Diese Bindung führt zur Induktion von Co-Aktivatoren und Co-Repressor Proteinen, welche die Expression von Genen beeinflussen. 2.) Der nicht-klassische Kinasen-Signalweg: Die Bindung von Testosteron an den AR führt zu Aktivierung der Src Tyrosin Kinase, welche über die Aktivierung des EGFR eine MAP-Kinasen-Kaskade anstößt, an deren Schluss CREB-abhängige Gene induziert werden. 3.) Der nicht-klassische  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg: Die Interaktion von Testosteron mit einem Plasmamembran Rezeptor führt über die Aktivierung der Phospholipase C und die Inhibierung von  $\text{K}^+$ ATP-Kanälen zur Membrandepolarisation und folglich zum intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg. AR = Androgen Rezeptor; ARE = Androgen Response Element; CREB = cAMP Response Element-Binding Protein; DAG = Diacylglycerin; EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor;

ERK = Extracellular Signal-Related Kinase; GPCR = G-Protein Coupled Receptor; HSP = Heat Shock Protein; IP<sub>3</sub> = Inositoltriphosphat; MAP = Mitogen-Activated Protein; MEK = MAPK/ERK-Kinase; P = Phosphat; PIP<sub>2</sub> = Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphonate; PLC = Phospholipase C; RAF = Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; Ras = Rat sarcoma; Src = Sarcoma; T = Testosteron. Abdruck nach freundlicher Genehmigung von Elsevier: Seminars in Cell & Developmental Biology (Smith & Walker 2014), Copyright 2014.

### 2.7.3. Nicht-klassische Signalwege von Testosteron

Neben dem klassischen Testosteron-Signalweg konnten in SC zwei weitere nicht-klassische Signalwege beschrieben werden: (a) der nicht-klassische Kinasen-Signalweg und (b) der nicht-klassische Ca<sup>2+</sup>-Influx-Signalweg.

(a) Beim nicht-klassischen Kinasen-Signalweg führt die Stimulation von SC mit Testosteron (10-250 nM) zu einer Translokation des AR an die Plasmamembran, wo eine Prolin reiche Region (Aminosäuren 352-359) des AR an die SH3 Domäne einer Src Tyrosin Kinase bindet und diese aktiviert (Abbildung 4, Mitte) (Migliaccio et al. 2000). Über einen intrazellulären Signalweg bewirkt Src die Phosphorylierung und Stimulation des Epidermal Growth Factor Rezeptors (EGFR) (Cheng et al. 2007). Dieser initiiert eine MAP (Mitogen-Activated Protein) -Kinasen-Kaskade, zu der die Kinasen Ras (Rat sarcoma), RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma), ERK (Extracellular Signal Related Kinase) und MEK (MAPK/ERK) gehören. Dies resultiert in der Aktivierung der intranukleären p90<sup>Rsk</sup> Kinase, welche den Transkriptionsfaktor cAMP Response Element-Binding Protein (CREB) phosphoryliert und somit die CREB-vermittelte Genexpression induziert (Fix et al. 2004). Der nicht-klassische Kinasen-Signalweg verläuft im Gegensatz zum klassischen Testosteron-Signalweg schnell (eine Minute), da er keine direkte AR-DNA-Interaktion benötigt und kann bis zu 12 h lang anhalten (Fix et al. 2004; Walker 2011).

(b) Der nicht-klassische Ca<sup>2+</sup>-Influx-Signalweg konnte in SC und daneben auch in IC-21 Zellen, einer SV40-transformierten peritonealen Mausmakrophagen-Zelllinie, und in der RAW 264.7 Mausmakrophagen-Zelllinie nachgewiesen werden (Gorczyńska & Handelsman 1995; Benten et al. 1999; Guo et al. 2002). Beim nicht-klassischen Ca<sup>2+</sup>-Influx-Signalweg kommt es innerhalb von 30-45 Sek. nach Stimulation mit Testosteron zu einem intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstieg (Benten et al. 1999; Guo et al. 2002). Testosteron bindet an einen bis dato nicht-identifizierten G<sub>q</sub>-Typ G-Protein-gekoppelten Rezeptor, was zur Aktivierung der Phospholipase C führt, die Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphonat (PIP<sub>2</sub>) in der Plasmamembran zu Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. Durch den Abfall der PIP<sub>2</sub>-Konzentration kommt es zum Verschließen von ATP-abhängigen K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-Kanälen (Von Ledebur et al. 2002).

Dies erhöht den Membranwiderstand und führt zur Depolarisation der Zelle. Folglich öffnen sich die spannungsabhängigen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und ermöglichen den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg (Lyng et al. 2000). Die genauen Zielgene und Prozesse der Spermatogenese, die durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg beeinflusst werden, sind bis heute nicht bekannt.

#### **2.7.4. Die immunsupprimierende Rolle von Testosteron**

Immer mehr Daten deuten darauf hin, dass Testosteron immunsupprimierende Eigenschaften besitzt, welche u. a. zur Entwicklung und Aufrechterhaltung des Immunprivilegs beitragen können. So wurde durch epidemiologische Studien gezeigt, dass Frauen statistisch signifikant häufiger als Männer an Autoimmunerkrankungen leiden (Cutolo et al. 2004; Klein 2012; Nussinovitch & Shoenfeld 2012). Weibliche Mäuse entwickelten im Vergleich zu männlichen Mäusen eine stärkere experimentelle Autoimmunencephalitis nach Transfer von Myelin-reaktiven T-Zellen (Bebo et al. 1999). Männliche, an Morbus Crohn erkrankte Probanden mit einem Hypogonadismus, die für 24 Monate parenteral Testosteron substituierten, wiesen signifikant erniedrigte Level von Leukozyten und C-reaktivem Protein sowie eine verminderte Krankheitsaktivität auf (Haider et al. 2010). Durch inhibitorische Effekte proinflammatorischer Zytokine bei systemischen, bzw. organspezifischen Entzündungen auf die gonadale Hypothalamus-Hypophysen-Achse kommt es hierbei zu niedrigen Testosteron-Spiegeln (Diemer et al. 2003). Wird in Ratten mit einer EAO Testosteron supplementiert, kann der Krankheitsgenese entgegengewirkt werden (Fijak et al. 2011). Des Weiteren zeigte Kelly, dass durch die Applikation von Testosteron die Entstehung von Arteriosklerose inhibiert wird (Kelly et al. 2012). Auch bei der Entstehung bzw. dem Verlauf von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Mellitus, Myasthenia Gravis oder Multipler Sklerose zeigte Testosteron einen immunsupprimierenden, krankheitsmodulierenden Effekt (Fitzpatrick et al. 1991; Duan et al. 2003; Gold & Voskuhl 2009). Nichtsdestotrotz sind die genauen Mechanismen, über die Testosteron seinen antiinflammatorischen Einfluss ausübt, bis dato weitgehend unerforscht.  $\text{CD4}^{+}$  T-Zellen produzieren, nach Stimulation mit Testosteron über den AR, höhere Mengen an immunsupprimierendem IL-10 (Liva & Voskuhl 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von isolierten T-Zellen aus der Milz mit LC konditioniertem Medium oder Testosteron alleine zu einem dreifachen Anstieg der  $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{Foxp3}^{+}$  (Forkhead-Box-Protein P3)  $\text{T}_{\text{Reg}}$ -Zellen und auch zu

einem Anstieg von IL-10 führte (Fijak et al. 2011; Fijak et al. 2015). In menschlichen gingivalen Fibroblasten führte eine erhöhte Konzentration von Testosteron zu einer verminderten Produktion von IL-6 (Gornstein et al. 1999). Insgesamt konnte demnach gezeigt werden, dass Testosteron inflammatorische Prozesse durch eine Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) und eine Förderung der Expression antiinflammatorischer Zytokine (IL-10, TGF- $\beta$ ) unterdrückt. In diese Richtung wirkt auch die Stimulation der Foxp3-Expression, die zu einer Differenzierung immunsuppressiver T<sub>Reg</sub> aus dem T-Zellpool führt (Bebo et al. 1999; Corcoran et al. 2011).

## 2.8. Zielsetzung der Arbeit

Eine wichtige Rolle von TM für die Entstehung und Erhaltung des Immunprivilegs des Hodens und somit die Konsolidierung männlicher Fertilität wird bereits seit vielen Jahren diskutiert (Pöllänen & Niemi 1987; Kern et al. 1995; Hayes et al. 1996; Hales 2002; Winnall & Hedger 2013; Bhushan et al. 2015). Während TM unter physiologischen Bedingungen einen primär antiinflammatorischen Phänotyp aufweisen, sind sie darüber hinaus fähig, über die Produktion proinflammatorischer Zytokine Entzündungen im Hoden zu initiieren und zu erhalten (Hales et al. 1992; Xiong & Hales 1993). Durch ihre Lokalisation im Interstitium sind sie hohen Konzentrationen von lokal produziertem Testosteron ausgesetzt. Testosteron stellt sowohl synthetisch als auch im Hoden einen wichtigen immunmodulierenden und antiinflammatorischen Faktor dar. Es übt seinen Einfluss sowohl zellulär mittels des AR über den klassischen Testosteron-abhängigen und den nicht-klassischen Kinasen-Signalweg als auch AR-unabhängig über den nicht-klassischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg aus (Smith & Walker 2014). Trotz detaillierter Kenntnisse über Androgen-Signalwege im Hoden, bleibt der genaue Einfluss von Testosteron auf TM unklar.

In der folgenden Arbeit soll überprüft werden, ob und inwiefern Testosteron einen Einfluss auf TM ausübt. Mittels zellbiologischer, molekularbiologischer (PCR) und biochemischer Methoden sollen die Expression vom AR und die mögliche Aktivierung nicht-klassischer Testosteron-Signalwege in TM untersucht werden. Außerdem soll die mögliche Wirkung von Testosteron auf die Expression kostimulatorischer Moleküle (CD80, CD86) und der Zytokine (MCP-1, IL-6 und IL-10) in TM unter entzündlichen Bedingungen erforscht werden.

Ziel ist es zu klären, ob Testosteron seinen antiinflammatorischen Einfluss nicht nur, wie bereits durch unsere Arbeitsgruppe aufgezeigt, in PTC und SC, sondern auch in TM ausübt. Hierdurch könnte sich ein Ansatz zur Behandlung fertilitätsschädigender, inflammatorischer Prozesse im Hoden ergeben.

### 3. Materialien

#### 3.1. Chemikalien

Art	Hersteller
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ampuwa® (für Injektionszwecke)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
D-Glukose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidium Bromid 10x	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Iod ( $\geq 99,8\%$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Methanol ( $\geq 99,8\%$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
2-Methylbutan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Milchtrockenpulver	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese Gel 30 Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Testosteron	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tris (Trometamol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland



### 3.2. Zellkultur: Medien und Antibiotika

Art	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ca-Mg-free HBSS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM/F12)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMEM (high glucose) Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMEM/F-12 (1:1) (1x) + GlutaMax™-I	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x) w/o Ca <sup>2+</sup> & Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Kollagenase I	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Minimal Essential Medium (MEM Eagle)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin, 100x, 10,000 units/ml, 10mg/ml	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Percoll®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
RPMI 1640 + L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

### 3.3. Zellkultur: Nutzmittel

Art	Hersteller
Microlance Nadeln, 12G	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, Deutschland
Falcon Behälter (15 ml/50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon® 70 µm Zellsieb	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Petri Schalen, 6 x 1,5 cm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Spritzen (Plastik) (5 ml/10 ml)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trypan Blau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zellkultur 6-Multiwell Platte	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur 24-Multiwell Platte	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur 96-Multiwell Platte	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

### 3.4. Enzyme

Art	Katalognummer	Hersteller
DNase I	# 10104159001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Hyaluronidase	# H3506	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kollagenase	# 10103586001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Trypsin	# T5266	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypsin Inhibitor	# T6522	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

### 3.5. Antikörper für Western Blot (\*WB) und Immunfluoreszenz (\*\*IF)

Primäre Antikörper	Hersteller	Katalog- nummer	Verdünnung (*WB, **IF)
Monoklonaler Kaninchen anti-Ratte $\beta$ -Actin IgG (13E5)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	# 4970	1:4000 in 5% Milch*
Monoklonaler Maus anti- Ratte CD68 (ED1) IgG1	AbD Serotec GmbH, Düsseldorf, Deutschland	# MCA341R	1:700; 1:100 in 2,5% BSA in PBS**
Monoklonaler Maus anti- Ratte CD163 (ED2) IgG1	AbD Serotec GmbH, Düsseldorf, Deutschland	# MCA342R	1:700; 1:100 in 2,5% BSA in PBS**
Polyklonaler Kaninchen anti-Ratte AR IgG (N-20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	# SC-816	1:700; 1:100 in 2,5% BSA in PBS** 1:1000 in 5% Milch*
Polyklonaler Kaninchen anti-Ratte p44/42 MAPK (Erk1/2)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	# 9102	1:1000 in 5% BSA in TTBS*
Polyklonaler Kaninchen anti-Ratte Phospho-p44/42 MAPK (p-Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	# 9101	1:1000 in 5% BSA in TTBS*
Monoklonaler Kaninchen	Cell Signaling	# 9198	1:1000 in 5%

anti-Ratte Phospho-CREB (Ser133) (87G3) mAb	Technology, Danvers, USA		BSA in TTBS*
--	-----------------------------	--	--------------

Sekundäre Antikörper	Hersteller	Katalog- nummer	Verdünnung (*WB, **IF)
Polyklonaler Esel anti- Maus IgG - FITC	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	# 017-090- 003	1:1000 in 2,5% BSA in PBS**
Polyklonaler Esel anti- Ratte IgG-Cy3	Chemicon, Hampshire, UK	# AP182C	1:2000 in 2,5% BSA in PBS**
Ziege anti-Kaninchen IgG, Horseradish Peroxidase konjugiert (HRP)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	# 0855676	1 : 10 000 in 5% Milch*

### 3.6. Versuchstiere

Art	Hersteller
Männliche Wistar Ratten 12 Wochen alt	Charles River Laboratorien Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland
Männliche juvenile Wistar Ratten, 19 Tage alt	Charles River Laboratorien Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland

### 3.7. PCR und RT-PCR

Reagenzien	Hersteller
100 bp DNA Marker	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
DNase I	Qiagen, Hilden, Deutschland
Nukleotide (dNTPs)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Go Taq® Flexi DNA Polymerase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Go Taq® Flexi Buffer (5x)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Go Taq® Flexi Green Buffer (5x)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
DNA Gel Ladepuffer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Oligo(dT)15 Primer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
PCR Nucleotid Mix	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
RNase A	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase Inhibitor	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase freies DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase freies H <sub>2</sub> O	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT-Puffer (5x)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq Polymerase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

Gen	Primer Sequenzen (5' → 3') F (Forward, vorwärts) R (Reverse, rückwärts)	PubMed Accession No./Kat. Nr.	En- trez Gene ID	Produkt Länge (Basen- paare)
3β-HSD	F: ATGCCCAGTACCTGAGGAGA R: TTGAGGGCCGCAAGTATCA	NM_0010 07719	360348	427
18s RNA	Rn_Rnr1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT001993 74	24721	103
Androgen Rezeptor	Rn_AR_2_SG QuantiTect Primer Assay	QT018124 33	24208	135
β2-Mikro- globulin	F: CCGTGATCTTTCTGGTGCTT R: AAGTTGGGCTTCCCATTC	NM_0125 12	24223	113
β-Actin	F: ATGGTGGGTATGGGTCAGAA R: GGGTCATCTTTTCACGGTTG	NM_0031 14.2	81822	232
CD80	Rn_Cd80_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT001990 59	25408	110
CD86	Rn_RGD:628714_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT001764 84	56822	105
CCL2 (MCP-1)	Rn_Ccl2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT001832 53	24770	117

Insl3	F: TGGCCACCAACGCTGTG R: ACCCAAAAGGTCTTGCT	NM_0536 80.1	114215	62
IL-6	Rn_Il6_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT001828 96	24498	128
IL-10	F: CAGCCGGGAAGACAATAACT R: GTTGTCCAGCTGGTCCTTTG	NM_0005 72	3586	160
LHR	F: CTGCGCCTTCAGGAATT TGCC R: AATCATAATCCCAGCCACT GAGTTCATTCT	NM_0129 78	25477	161
PGK-1	Rn_Pgk1_3_SG QuantiTect Primer Assay	QT000137 76	5230	149

### 3.8. Materialien für die Immunfluoreszenz

Art	Hersteller
Dako Stift	Dako Germany GmbH, Hamburg, Deutschland
Deckgläser (rund, 12 mm)	Gerhard Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser (24 x 60 mm)	Gerhard Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
SuperFrost plus Objektträger	R. Langenbrinck, Labor- & Medizin- technik, Emmendingen, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T. Kryoeinbettmedium, 125 ml	Sakury Finetec Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories, Inc., Birmingame, USA

### 3.9. Immunoblot Materialien

Art	Hersteller
Hybond ECL Membran 0.2 µm	Amersham, Freiburg, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Pierce™ ECL Western Blot Substrat	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Ponceau S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SuperSignal® West Pico Chemilumineszenz Substrat	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Whatman 3MM Blotting Papier	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland

### 3.10. Materialien für intrazelluläre Calcium Messungen

Art	Hersteller
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Delta-T-Schale	FEI Munich GmbH, Gräfeling, Deutschland
Fura-2-AM	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

### 3.11. Geräte und Software

Art	Hersteller
iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophorese Kammer Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophoresis Consort E832 Power Supply	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Elektronische Waage SPB50	Ohaus, Giessen, Deutschland

Fluoreszenz Mikroskop Axioplan 2 imaging mit AxioCam	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Fusion-FX7 Spectra	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037 USA
Heizblock HX-2	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Horizontaler Schüttler	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
ImageJ Software	National Institute of Health, Bethesda, Vereinigte Staaten
Intas Gel Imaging UV System	Intas Science Imaging Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland
Invertiertes Mikroskop Olympus CKX41SF (mit Olympus Camedia C- 7070)	Olympus Optical Co., Ltd und Olympus Imaging Corp., Tokyo, Japan
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
iQ 5 Optical System Software Version 2.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Küvette Hellendahl	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnetischer Rührer RCT	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Microm HM 560 Kryostat	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Microsoft Office for Mac 2011	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Mikrowelle	Samsung Electronics GmbH, Schwalbach, Deutschland
Nano Drop ND 2000	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Olympus Kamera Mikroskop verbunden mit einem Monochromator	FEI Munich GmbH, Gräfeling, Deutschland



PCR Thermocycler	Biozyme, Oldendor, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
SDS Gel Elektrophorese Kammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Deutschland
Semi-dry Elektrophorese Blotter Perfect Blue, 20 x 20 cm	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Deutschland
Trans-Blot™, Semi-dry	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tillvision Software 2.0	FEI Munich GmbH, Gräfeling, Deutschland
Waage Scaltec SPB53	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
(Mini) Zentrifuge MC6	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Pico-21	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Zählkammer Bürker	LO – Laboroptik GmbH, Marienfeld, Deutschland
Zeiss AxioVision Software 4.8.1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland
Zellkultur CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland

### 3.12. Puffer, Lösungen und Gele für biochemische Experimente

NP-40 Lysis Puffer		Transfer Puffer (halb-trocken)	
NaCl	150 mM	Tris	48 mM
NP-40	1%	Glycin	39 mM
Tris-HCl, pH = 8,0	50mM	Methanol	20%
Protease Inhibitor	Dazugeben	SDS	0,04%

**Tris-HCl Puffer 1,5 M, pH = 8,8**

Tris	1,5 M
Titrieren mit 37% HCl	

**RIPA Lysis Puffer**

NaCl	150 mM
Triton x-100	0,1%
Sodium Deoxycholate	0,5%
SDS	0,1%
Tris-HCl, pH = 8,0	50 mM

**Transfer Puffer (semi-dry)**

Tris	48 mM
Glycin	39 mM
Methanol	20%
SDS	0,04%

**Stripping Puffer (500 ml)**

Aqua dest.	Bis 500 ml füllen
10% SDS	10 %
1 M Tris pH = 6,8	31,25 ml
β-Mercaptoethanol	4 ml

**10% APS Puffer (10 ml)**

Aqua dest.	
APS	1%

**Tris-HCl Puffer 0,5 M, pH = 6,8**

Tris	0,5 M
Titrieren mit 37% HCl	

**Laemmli 2 x Probenpuffer**

Glycerol	20%
Tris-HCl	125 mM
2-Mercaptoethanol	10%
SDS	4%
Bromophenol Blau	0,004%

**TBST 10 x , pH = 7,6**

Aqua dest.	Bis 1l auffüllen
Tris Base	24 g
NaCl	88 g
Tween 20	1 ml

**Running Puffer, pH = 8,3**

Tris Base	25 mM
Glycin	190 mM
SDS	0,1%

**10 % SDS Puffer (50 ml), pH = 6,8**

Aqua dest.	Bis 50 ml füllen
SDS	5 g SDS

**12,5% Trenngel (10 ml)**

Aqua dest.	3,17 ml
1,5 M Tris-HCl, pH = 8,8	2,5 ml
10% SDS	100 µl
Acrylamid	4,17 ml
APS 10%	50 µl
TEMED	5 µl

**4% Sammelgel (5 ml)**

Aqua dest.	3,0 ml
0,5 M Tris-HCl	1,25 ml
10% SDS	50 µl
Acrylamid	0,65 ml
APS 10%	25 µl
TEMED	5 µl

**10 x PBS, pH = 7,4**

Aqua dest.	Bis 1 l füllen
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g

**HEPES Puffer, pH = 7,4**

KCl	5,0 mM
NaCl	140 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,3 mM
D-Glukose	5,5 mM
HEPES	10 mM

**2,5 % BSA in PBS (1x)**

PBS 1x	x l
BSA	2,5 %

**Blockpuffer**

BSA	5%
Gelöst in TBS+0,1%Tween	

**Ponceau S Lösung**

Ponceau S	2%
Trichloressigsäure	30%
Sulfosalicyl Säure	30%

**6x DNA Probenpuffer**

Bromophenol Blau	0,25%
Glycerol	30%

**1xTAE Puffer**

Tris Acetat	40 mM
EDTA, pH = 8,0	1 mM

### 3.13. Puffer und Lösungen für Zellkultur

#### PBS A

D-Glukose	<i>1,5 mg/ml</i>
Penicillin/Streptomycin	<i>1%</i>

#### Isolationsmedium für PTC

Fetales Kälberserum (FCS) in RPMI 1640	<i>10%</i>
Penicillin/Streptomycin	<i>1%</i>

#### Trypsin Inhibitor A Lösung in PBS

Trypsin Inhibitor	<i>10 mg/ml</i>
-------------------	-----------------

#### Trypsin Inhibitor B Lösung in PBS

Trypsin Inhibitor	<i>2,5 mg/ml</i>
-------------------	------------------

#### Kollagenase-Hyaluronidase-DNase Lösung

Kollagenase	<i>1 mg/ml</i>
Hyaluronidase	<i>1 mg/ml</i>
DNase	<i>30 µg/ml</i>

#### Isolationsmedium für TM

Penicillin/Streptomycin in DMEM:F12 Medium	<i>1%</i>
---	-----------

#### Isolationsmedium für SC

Penicillin/Streptomycin in RPMI 1640	<i>1%</i>
---	-----------

#### Trypsin-DNase Lösung

Trypsin	<i>2,5 mg/ml</i>
DNase I	<i>30 µg/ml</i>

#### Kollagenase-Hyaluronidase-DNase Lösung

Hyaluronidase	<i>1 mg/ml</i>
DNase	<i>30 µg/ml</i>

## 4. Methoden

### 4.1. Umgang mit den Versuchstieren

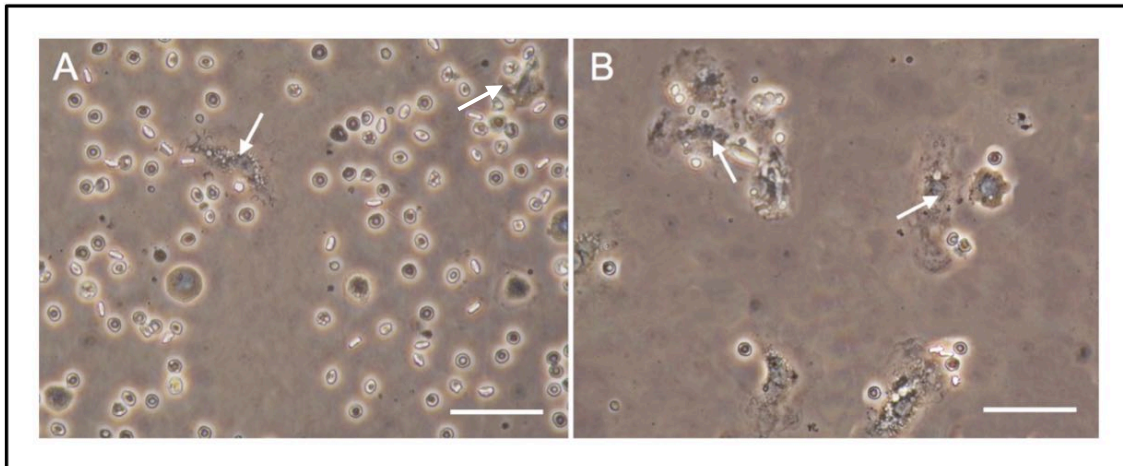
Die männlichen Wistar Ratten wurden von Charles River Laboratories Germany GmbH bezogen. Jegliche Tiertötungen zwecks Organentnahme waren von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießens (GI 20/23), Gießen, Deutschland (Genehmigungsnummer GI 20/23 – Nr. 31/2012) im Vorfeld genehmigt worden. Auch die Tierversuche zur Induktion der EAO in Wistar Ratten nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurden von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießens (GI 20/23), Gießen, Deutschland (Genehmigungsnummer GI 20/23 – Nr. 32/2008) genehmigt. Der Umgang wurde stets ordnungsgemäß nach den Empfehlungen für den Umgang und den Nutzen von Labortieren des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

### 4.2. Isolierung von testikulären Makrophagen

Die Isolierung von TM wurde nach einem modifizierten Protokoll von Yee und Hutson durchgeführt (Yee & Hutson 1983).

Vier 12 Wochen alte Ratten wurden durch eine CO<sub>2</sub>-Überdosis und einen Schnitt durch die Vena cava superior geopfert. Die Hoden wurden entnommen und im Anschluss in einer mit 15 ml DMEM/F-12 (1:1)(1x)+GlutaMax<sup>TM</sup>-I Medium gefüllten Petri Schale dekapsuliert. Beim Dekapsulieren wurde darauf geachtet, kleine Blutgefäße sorgfältig zu entfernen. Die Tubuli seminiferi contorti wurden vorsichtig mit einer gebogenen Semken Pinzette dissoziiert (Hedger & Eddy 1986). Eine enzymatische Reaktion zur Isolierung der TM wurde nicht angewandt, da diese einen potenziellen Einfluss auf die Funktion der Zellen ausüben würde. Die voneinander gelösten Tubuli samt dem Medium wurden in ein 50 ml Falcon Gefäß überführt und das Volumen bis auf 50 ml mit Medium aufgefüllt. Nach einer Zeit von 5 Min. zum Absinken der tubulären Fragmente, wurde der Überstand in ein neues 50 ml Falcon Gefäß transferiert und mit 300 x g für 10 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entsorgt und das resultierende Zellpellet in der gewünschten Menge in TM Medium (DMEM/F-12 (1:1)(1x)+GlutaMax<sup>TM</sup>-I Medium) resuspendiert. Für eine 6-Well-Platte wurden 9 ml Medium addiert, je 1,5 ml pro Well hineingegeben und im

Anschluss für 30 Min. bei 32°C inkubiert. Für die Immunfluoreszenz wurden 0,5 ml von der Zellsuspension auf 12 mm Deckgläser pro Well einer 24-Well-Platte gegeben und bei 32°C inkubiert. Durch die rapide Adhärenz der TM auf dem Boden der 6-Well-Platte wurden kontaminierende Zellen durch extensives Waschen mit vorgewärmtem Medium (32°C) entfernt (Abbildung 5 A, B).

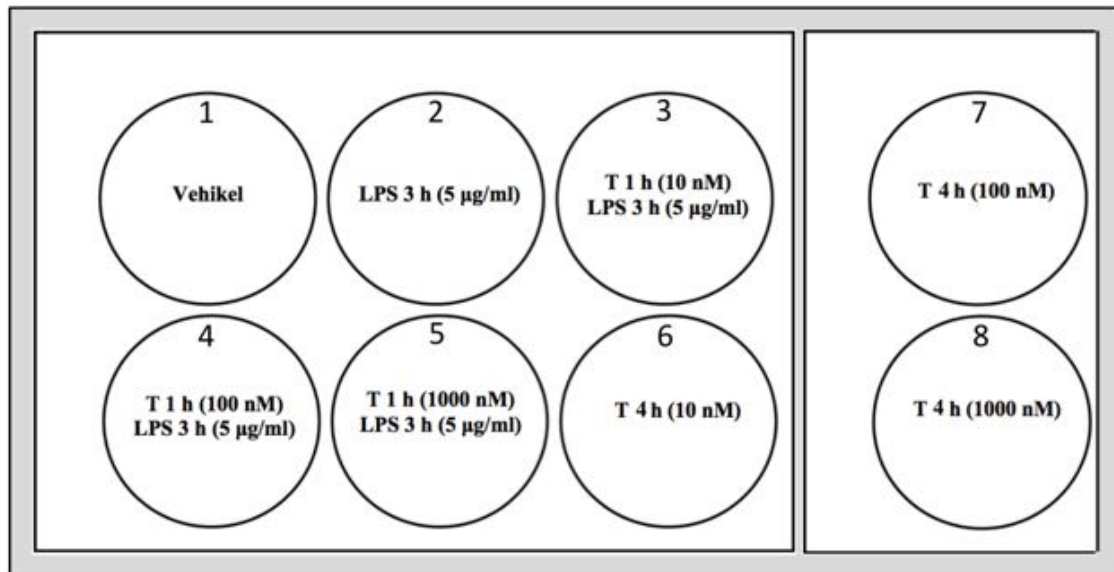


**Abbildung 5: Isolation und Aufreinigung der TM.** Die testikuläre Ausgangszellpopulation (A) wurde durch das mehrfache Waschen von nicht-adhären Zellen aufgereinigt. (A) Zeigt die angereicherten TM (siehe Pfeile) nach 30 Min. Inkubation bei 32°C. (B) Auf Grund der schnellen Adhärenz der TM konnten kontaminierende, nicht-adhären Zellen durch wiederholtes Waschen mit vorgewärmtem Medium entfernt werden. Die Skalierungsleiste repräsentiert 30 µm.

### 4.3. Behandlung von testikulären Makrophagen

In folgendem Experiment wurde der Einfluss von Testosteron auf die Produktion der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und der inflammatorischen Mediatoren MCP-1, IL-6 und IL-10 in TM nach Stimulation mit LPS untersucht.

Dazu wurde der unter Abbildung 6 dargestellte Versuchsaufbau gewählt.



**Abbildung 6: Versuchsaufbau der Behandlung testikulärer Makrophagen mit LPS und Testosteron.** In jeden der Wells wurden 1,5 ml TM Suspension in DMEM/F-12 GlutaMax™-I Medium ausplattiert. Zusätzlich wurden in den ersten Well 1 µl/ml 98% Ethanol als Vehikel gegeben, in den zweiten LPS (5 µg/ml) für 3 h. In dem dritten, vierten und fünften Well wurden die TM erst 1 h mit 10 nM, 100 nM und 1000 nM Testosteron behandelt und anschließend für 3 h LPS (5 µg/ml) hinzugefügt. In den sechsten, siebten und achten Well wurde ausschließlich Testosteron in aufsteigender Konzentration (10 nM, 100 nM, 1000 nM) für 4 h gegeben. (T = Testosteron)

Vor Beginn der Behandlung wurde eine 10 mM Testosteron Stocklösung in 98% Ethanol hergestellt. Die frisch isolierten TM wurden in 12 ml TM Medium gelöst und jeweils 1,5 ml nach dem oben beschriebenen Aufbau in acht Wells von zwei 6-Well-Platten gegeben. Zuerst wurden direkt hintereinander 1,5 µl 98% Ethanol in Well eins, 1,5 µl Testosteron (aus der 10 µM Stocklösung) in Well drei und sechs, 1,5 µl Testosteron (aus der 100 µM Stocklösung) in Well vier und sieben sowie 1,5 µl Testosteron (aus der 1 mM Stocklösung) in Well fünf und acht gegeben. Folglich betrug die Testosteron Konzentrationen in Well drei und sechs 10 nM, in den Wells vier und sieben 100 nM und in den Wells fünf und acht 1000 nM. Nach 1 h wurden in den Wells zwei bis fünf je 7,5 µl LPS Stock (aus der 1 mg/ml Stocklösung) gegeben, sodass eine Konzentration von 5 µg/ml erreicht wurde. Nach weiteren 3 h wurden die Zellen direkt auf Eis gelegt, um weitere Reaktionen und Stoffwechselvorgänge zu unterbrechen und mit nachfolgenden biochemischen Untersuchungen zu beginnen.

#### 4.4. Isolierung von Sertoli und peritubulären Zellen

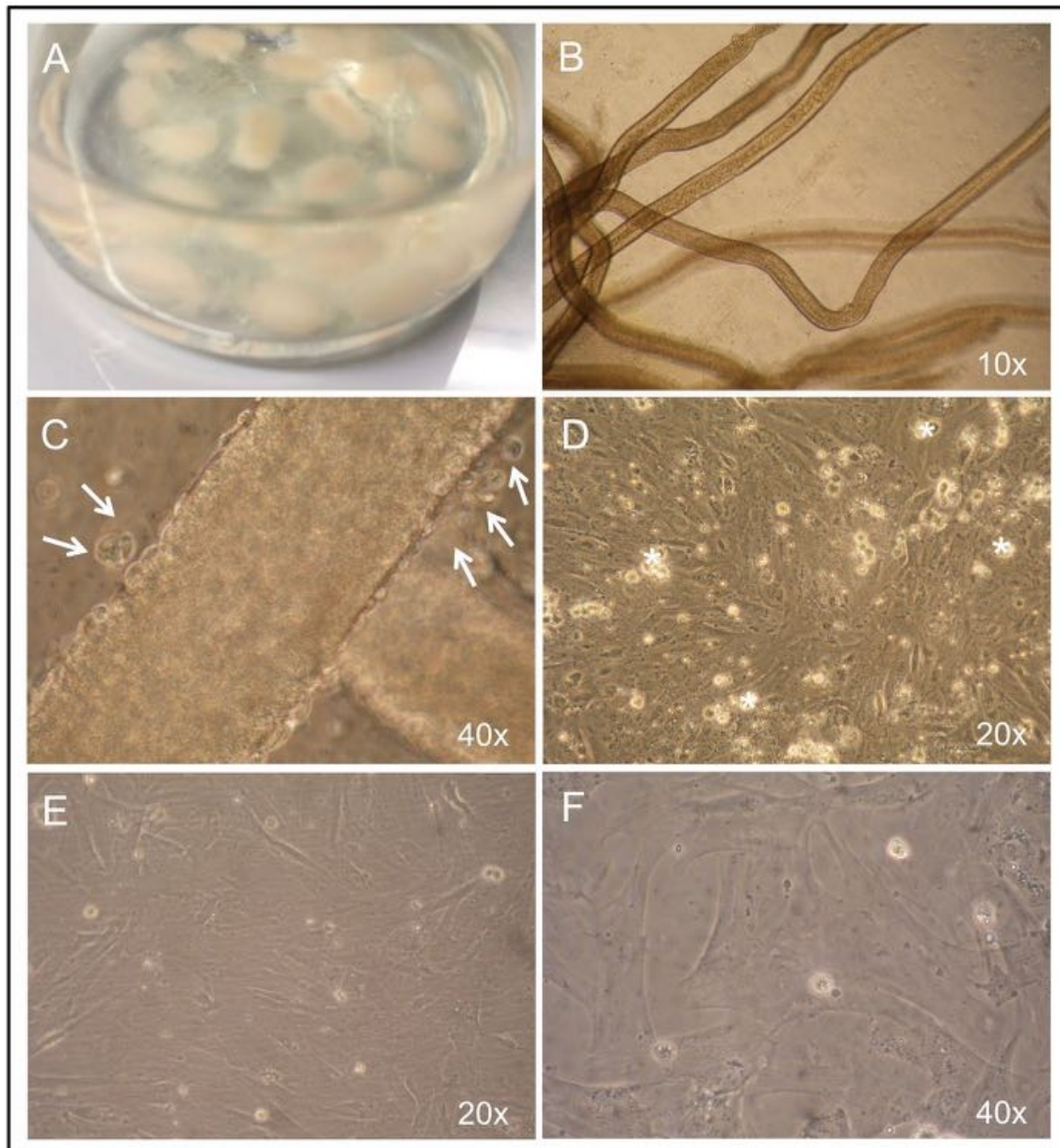
Die Isolierung von PTC und SC wurde nach einem modifizierten Protokoll von Hedger und Eddy durchgeführt (Hedger & Eddy 1986).

Drei 19 Tage alte Ratten wurden mittels einer Überdosis CO<sub>2</sub> und eines Schnittes durch die Vena cava superior geopfert. Die Hoden wurden entnommen, in PBS A Lösung gelegt, gefolgt von einer Desinfektion in 20 ml 1% Jod-Ethanol Lösung für 30 s. Die Hoden wurden dreimal in PBS A gewaschen und anschließend dekapsuliert (Abbildung 7 A). Die Tubuli seminiferi wurden für 6 Min. mit Trypsin-DNase Lösung in einem Schüttel-Wasserbad bei 32°C verdaut (140 Oszillierungen/min). Hierbei wurden die intakten Tubulifragmente freigesetzt (Abbildung 7 B). Alle Enzymlösungen wurden vorher durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert. Nach fünf Minuten wurde der Überstand verworfen. Die enzymatische Verdauung wurde durch Trypsin Inhibitor A und B gestoppt. Anschließend wurden die Tubulifragmente 7 x mit PBS A gewaschen, um unerwünschte Zellen, wie Keimzellen und interstitielle Zellen, zu entfernen. Die Tubulifragmente wurden in Kollagenase-Hyaluronidase-DNase Lösung in einem Schüttel-Wasserbad bei 32°C für 15 Minuten weiter verdaut.

#### **4.4.1. Spezifische Schritte während der Isolierung von peritubulären Zellen**

Durch das aus der Verdauung resultierende Verkürzen der Tubulifragmente und Auflösen der Lamina propria, wurden PTC langsam freigesetzt (Abbildung 7 C). Für 10 Min. wurde die Lösung mit den Tubulifragmenten zum Sedimentieren stehen gelassen und im Anschluss der PTC enthaltende Überstand gewonnen (Abbildung 7 D). Folgend wurde PTC Medium hinzugefügt und das Gemisch für 10 Min. bei 280 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml PTC Medium gelöst und bei 37°C kultiviert. Drei Tage nach der Isolierung wurden die PTC passagiert (Abbildung 7 E, F). Zwei Tage vor der Durchführung der Experimente wurden 5 x 10<sup>5</sup> Zellen/Well in eine 6-Well-Platte überführt und in RPMI-1640 Medium mit 10% FKS kultiviert.



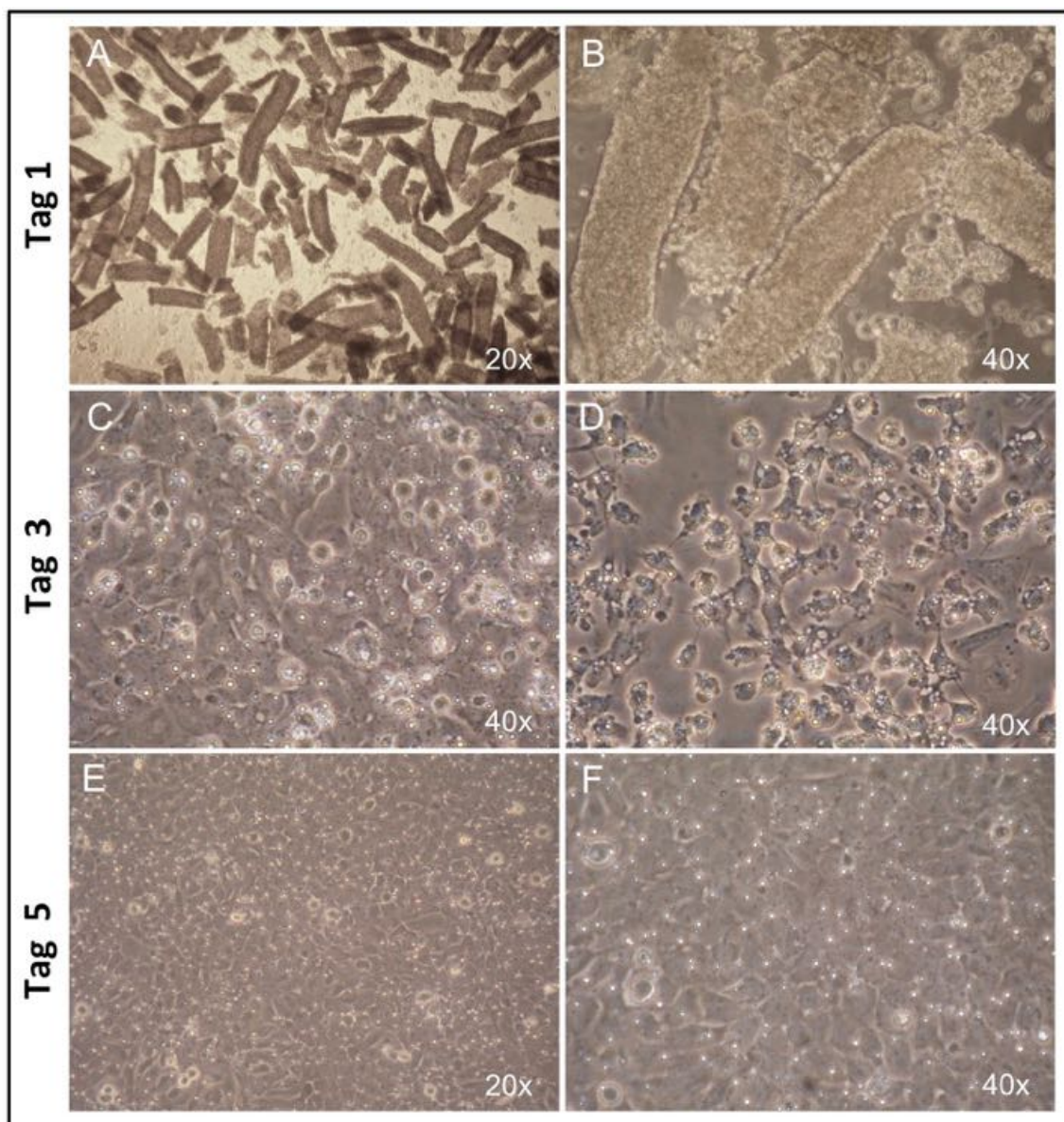


**Abbildung 7: Übersicht der Schritte zur Isolierung von peritubulären Zellen aus Rattenhoden.** Nach vorsichtiger Entfernung der Tunica albuginea (A) wurden die Tubuli seminiferi für 6 Min. mit Trypsin-DNase Lösung in einem Schüttel-Wasserbad inkubiert, was zur Freisetzung der intakten Tubuli führte (B). Nach 15-minütiger Verdauung mit Kollagenase-Hyaluronidase-DNase Lösung wurden PTC aus den Tubuli in den Überstand freigesetzt (C, siehe Pfeile). Kontamination mit anderen nicht-adhären Zellen (D), wie z.B. Keimzellen (siehe \*), wurde durch die Zell-Passage (auch bezeichnet als Subkultivierung oder Zellsplitting) minimiert, sodass eine weitgehend reine Population von PTC erreicht werden konnte (E, F).

#### 4.4.2. Spezifische Schritte zur Isolierung von Sertoli Zellen

Zur Isolierung von SC wurden die verbleibenden Tubuli seminiferi 4 x in PBS A gewaschen und anschließend in Hyaluronidase-DNase Lösung für 7-10 Min. in einem Schüttel-Wasserbad bei 32°C für 7-10 Min. weiter verdaut, bis die Tubuli verkürzt und freigesetzte Zellen ersichtlich waren (Abbildung 8 A, B). Die Tubuli wurden 4 x mit PBS A gewaschen und im Anschluss 20 ml SC Medium hinzugefügt. Zum Lösen der

Zellaggregate wurden die Tubuli 10 x durch eine 18 G Nadel gezogen. Die Zelllösung wurde durch ein 70 µm Zellsieb filtriert und für 10 Min. bei 200 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach Verwurf des Überstandes in SC Medium gelöst. Die Zellen wurden mithilfe der Bürker Zählkammer gezählt.  $3 \times 10^6$  Zellen/Well wurden in eine 6-Well-Platte überführt und bei 32°C inkubiert. Am dritten Tag der Kultivierung wurde eine Hypotone-Schock-Behandlung zur Entfernung von verunreinigenden Keimzellen durchgeführt (Abbildung 8 C, D). Dazu wurden die SC 2 x mit PBS gewaschen und für 90 s in 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5) inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für zwei weitere Tage in RPMI-1640 Medium kultiviert (Abbildung 8 E, F).



**Abbildung 8. Übersicht der Schritte zur Isolierung von Sertoli Zellen aus Rattenhoden.**  
SC wurden aus den mit Hyaluronidase-DNase Lösung verdauten kleinen Tubuli

Fragmenten freigesetzt (A, B). Nach dreitägiger Kultivierung (C) wurden kontaminierende Zellen durch einen hypotonen Schock entfernt (D). Direkt nach dem hypotonem Schock waren die SC sichtlich geschrumpft (D). Nach zwei weiteren Tagen zeigten die SC wieder ihre charakteristische kopfsteinpflasterartige Morphologie (E, F).

#### **4.5. Isolierung von Leydig Zellen**

Die Isolierung von Leydig Zellen (LC) wurde nach einem modifizierten Protokoll von Schumacher durchgeführt (M. Schumacher et al. 1978).

12 Wochen alte Ratten wurden durch eine CO<sub>2</sub>-Überdosis gefolgt von einer Eröffnung der Vena cava superior geopfert. Danach wurden die Hoden herauspräpariert und die Tunica albuginea vorsichtig entfernt. Der dekapsulierte Hoden wurde anschließend im Schüttelwasserbad für 20 Min. bei 37°C in Kollagenase I (0,25 mg/ml in 0,1% BSA in MEM) inkubiert. Der Überstand wurde durch einen 70 µm Zellsieb filtriert und im Anschluss bei 300 x g für 10 Min. bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml 1% HBSS in BSA resuspendiert und erneut bei gleicher Geschwindigkeit und Zeit zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt, um alle Reste der Kollagenase zu entfernen. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 6 ml 1% BSA in HBSS gelöst, davon 3 ml auf einen diskontinuierlichen Percoll (20, 40, 60 und 90% Percoll in HBSS) Gradienten gegeben und bei 800 x g für 20 Min. bei 20°C zentrifugiert. Die ersten beiden Zellringe wurden verworfen, 15 ml vom oberen Teil des LC enthaltenden dritten Zellringes gewonnen und in 30 ml 1% BSA in HBSS verdünnt. Nachfolgend wurde die Zellsuspension bei 350 x g für 10 Min. bei 20°C zentrifugiert. Die aufgereinigten Zellen wurden zweimal mit DMEM-F12 gewaschen und in DMEM-F12 (supplementiert mit 15 mM HEPES (pH 7,4), 500 ng/ml Insulin, 1 mg/ml BSA, 365 mg/l Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) gelöst. Es wurden 1x10<sup>4</sup> Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte gegeben und mit hCG (10 ng/ml) für weitere 20 h inkubiert, um anschließend für Experimente genutzt zu werden.

#### **4.6. Anfertigung von Kryostatschnitten aus den Rattenhoden**

12 Wochen alte Ratten wurden durch eine CO<sub>2</sub>-Überdosis mit einem nachfolgenden Schnitt durch die Vena cava superior geopfert und die Hoden entnommen. Die frisch isolierten Rattenhoden wurden dreimal mit PBS gewaschen, um kontaminierendes Blut

zu entfernen. Direkt im Anschluss, zwecks optimalem Gewebeerhalt, wurden sie in einem mit Isopentan gefüllten Metallbecherglas in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dazu wurde das mit Isopentan gefüllte Metallbecherglas für 10 Min. in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die Hoden wurden mit Hilfe einer Pinzette für 10 s in das Metallbecherglas gegeben. Die schockgefrorenen Hoden wurden vor dem Schneiden in Tissue-Tek® O.C.T. (Optimal Cutting Temperatur Compound, bestehend aus <11% Polyvinylalkohol, Carbowax <5%, nichtreaktive Zutaten >85%) eingebettet. Die Schnitte wurden mit dem Microm™ HM 560 Kryostat von Thermo Fisher Scientific angefertigt. Die Schnittdicke betrug 8 µm. Verbleibende Gewebeproben wurden bei -80°C aufbewahrt.

#### **4.7. Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl wurde nach herkömmlicher Methode mit der Bürker-Zählkammer und folgender Formel bestimmt:

$\text{Zellzahl/ml} = \text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor}$

Der Kammerfaktor beträgt  $10^4$ .

Die Zellsuspension wurde mit Trypanblau verdünnt und auf die Zellkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden 25 Quadrate unter Gebrauch der „L-Regel“ ausgezählt. Anschließend wurde die Zellzahl nach oben genannter Formel berechnet.

#### **4.8. Immunoblot Verfahren**

Immunoblot ist ein Verfahren zum Transfer von Proteinen aus einem SDS PAGE (engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) Gel auf eine Trägermembran zur gezielten Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper. Dabei werden die Proteine nach Auftrennung in der SDS-PAGE entsprechend ihrer Größe und Ladung durch Kapillarkwirkung, Diffusion oder Elektrophorese auf eine Trägermembran übertragen (engl. Blotting).

##### **4.8.1. Probengewinnung**

Sowohl TM, LC als auch SC wurden mit dem Immunoblot Verfahren untersucht. Die Zellen wurden direkt nach der Isolierung auf Eis gelegt. Es folgte eine einmalige Waschung mit PBS (1x). Die Zelllysis wurde für die SC und LC mit 300 µl Laemmli Puffer pro Well einer 6-Well-Platte durchgeführt. Für die TM wurde auf Grund der



geringeren Zellzahl nur 70 µl Laemmli Puffer pro Well genutzt. Die mit dem Laemmli Puffer versetzten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Platte entfernt und in einem Eppendorf Gefäß für 10 Min. bei 96°C gekocht.

#### **4.8.2. Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE wird zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld durchgeführt (Towbin et al. 1979). Für das Trenngel wurde ein Prozentsatz von 10%, passend zum Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine, gewählt. 5 ml der Trenngel-Lösung wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurden 1,5 ml des 4%igen Sammelgels hinzugefügt und ein Taschenkamm von oben eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit Elektrophorese Puffer gefüllte SDS-PAGE Gelelektrophorese Kammer gesetzt. Das mit Probenpuffer versetzte Zelllysate wurde in die einzelnen Taschen des Sammelgels gefüllt. Ein Proteingrößenmarker wurde in die erste Tasche des Sammelgels aufgetragen. Die SDS-PAGE Gelelektrophorese wurde für 2 h bei einer Spannung von 125 V durchgeführt.

#### **4.8.3. Semi-dry Blotting Verfahren**

Nach Beendigung der SDS-PAGE Gelelektrophorese wurden die Gele entnommen. Gefolgt auf einen Waschvorgang in destilliertem H<sub>2</sub>O, wurden sie in Transfer Puffer übertragen. Dann wurden die Proteine auf eine zuvor in Transfer Puffer (semi-dry) eingeweichte Nitrozellulosemembran mit einem Semi-Dry Blotter für 1,5 h bei 120 mA transferiert. Die Effizienz des Transfers wurde mittels einer Ponceau S-Färbung validiert.

#### **4.8.4. Immunoblot Analyse**

Nach der erfolgreichen Kontrolle mittels Ponceau S Färbung wurde die Nitrozellulosemembran mit TBST gewaschen und für 1 h in Blockpuffer (5% BSA in TBST) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper ü.N. bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die Membranen 3 x mit TBST für 5 Min. gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper inkubiert. Die Konzentrationen der einzelnen verwendeten Antikörper sind den Materialien unter 2.5. zu entnehmen. Folgend wurde 3 x 10 Minuten mit TBST gewaschen. Die Membranen mit Proben aus SC und LC wurden für 4 Minuten mit Pierce™ ECL Substrat inkubiert, während die Membranen mit Proben aus TM für 4

Minuten mit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrat inkubiert wurden. Die Bilder wurden mit dem Fusion-FX7 Spectra und der zugehörigen Software erstellt.

#### **4.8.5. Stripping der Immunoblot Membran**

Um ein und dieselbe Membran für verschiedene Proteinuntersuchungen nutzen zu können, mussten die gebundenen primären und sekundären Antikörper entfernt werden. Hierzu wurde ein sogenannter Stripping-Puffer eingesetzt (siehe 3.12.). Der Stripping Puffer wurde auf 60°C erwärmt und mit der Membran für 1 Min. unter leichter Schüttelbewegung inkubiert. Abschließend wurde die Membran 3 x 5 Min. in TTBS gewaschen, um jegliches  $\beta$ -Mercaptoethanol zu entfernen.

#### **4.8.6. Immunoblot Quantifizierung**

Zur Quantifizierung der Blots wurde die Software ImageJ (National Health Institute, USA) verwendet. Die Software erfasst die Bilder und führt eine relative Quantifizierung der Chemilumineszenz im Vergleich mit den Lade-Kontrollen (Vehikel) der Banden durch, mittels welcher numerische Werte entsprechend der Bandenintensität generiert werden (Taylor et al. 2013). Die hiermit erzeugten Werte wurden zur weiteren Analyse und graphischen Darstellung mit der Graph Pad Prism 7 Software ausgewertet.

### **4.9. Immunfluoreszenz**

Immunfluoreszenz (IF) ist ein Verfahren zum fluoreszenzbasierten Nachweis von Antigenen mittels spezifischer Antikörper in Gewebeschnitten oder kultivierten Zellen.

#### **4.9.1. Immunfluoreszenzfärbung der isolierten testikulären Zellen und kryokonservierten Hodenschnitte**

Die Darstellung von ED1, ED2 und AR in isolierten TM, SC und PTC wurde auf runden 12 mm Objektträgern in einer 24-Well-Platte durchgeführt. Die Färbung von ganzen Hodenschnitten geschah auf SuperFrost Plus Objektträgern. Die weiteren Schritte sind für die isolierten Zellen, wie auch die Hodenschnitte gleich.

Zuerst wurden die primären Zellen, bzw. Hodenschnitte, mit PBS + 0,05% Tween 20 für 5 Min. gewaschen und in 100%igem Isopropanol 10 Min. bei -20 °C fixiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBST wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine 1-stündige Inkubation mit 5% BSA in PBS geblockt. Nachfolgend wurde erneut auf gleiche Weise dreimal gewaschen. Für die auf Objektträgern fixierten Hodenschnitte wurde eine Feuchtkammer mit Zellstoff vorbereitet und ein Dako-Stift-Film um die

Probe herum aufgetragen. Die Antikörperlösung wurde auf die Probe getropft, sodass sich eine Oberflächenspannung bildete. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal für je fünf Minuten mit PBST gewaschen. Im Anschluss folgte die Inkubation für 1 h mit dem Zweitantikörper. Die ungebundenen sekundären Antikörper wurden durch 3-maliges Waschen mit PBS + 0,05% Tween entfernt. Abschließend wurden die Objektträger mit Vectashield Mounting Medium mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eingedeckelt.

Die Bilder wurden mit dem Fluoreszenz Mikroskop Axioplan 2 Imaging, welches mit der Zeiss AxioCam ausgestattet ist, aufgenommen.

## **4.10. Polymerase Kettenreaktion**

### **4.10.1. Umgang mit RNA**

Zum Schutz vor ubiquitären RNasen war das Tragen von sterilen Handschuhen und die Nutzung von autoklavierten Instrumenten zwingend notwendig. Für die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) wurden alle Arbeiten unter einer Sterilbank durchgeführt.

### **4.10.2. RNA-Isolierung aus testikulären Makrophagen**

Die Isolierung der gesamten RNA aus TM wurde mit dem RNeasy ® Micro Kit von der Firma Qiagen gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Nachdem die gewünschten Zellen isoliert wurden, erfolgte die Behandlung in einer 6-Well-Platte nach dem unter 4.3. (Abbildung 6) beschriebenen Versuchsaufbau. Anschließend wurden diese direkt mit 350 µl RLT Puffer pro Well lysiert. Der mit dem Kit gelieferte RLT Puffer inaktiviert RNasen und andere Proteine, um die RNA vor dem Abbau zu schützen. Dem RLT Puffer wurde vor Beginn  $\beta$ -Mercaptoethanol (10 µl  $\beta$ -ME mit 1 ml RLT Puffer) hinzugefügt. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber eingesammelt, in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und mit einem Vortexer gemischt. Zur Homogenisierung wurde das Lysat mit einer RNase freien 0,9 mm Spritze auf- und abgezogen. Anschließend wurde 350 µl 70%iges Ethanol beigemischt. Die Probe wurde direkt in die RNeasy MinElute Spin Trennsäule gegeben, welche zuvor in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß eingesetzt worden war. Die Probe wurde für 15 s bei 12 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dann wurden 350 µl RW1 Puffer in die

RNeasy MinElute Spin Trennsäule gegeben und erneut für 15 s bei 12 000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.

In den folgenden Schritten wurde stets nach Pufferzugabe zentrifugiert. Es wurden 80 µl DNase I (27 Kunitz Einheiten) in RDD Puffer direkt in die RNeasy MinElute Spin Trennsäule gegeben und für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Folglich wurden 350 µl RW1 Puffer hinzugefügt und für 15 s bei 12 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nun wurde die RNeasy MinElute Spin Trennsäule in ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und es wurden 500 µl RPE Puffer hinzugefügt. Es wurde für 15 s bei 12 000 rpm zentrifugiert und der Überstand im Anschluss verworfen. Folgend wurden 500 µl 80%iger Ethanol zugegeben, mit verschlossenem Deckel für 15 s bei 12 000 rpm zentrifugiert und der Überstand wie in den vorigen Schritten verworfen. Nachdem die RNeasy MinElute Spin Trennsäule in ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß übertragen wurde, wurde beim nächsten Schritt für 15 s bei 12 000 rpm zentrifugiert und der Überstand sowie das Mikroreaktionsgefäß im Anschluss verworfen. Um die RNA zu eluieren, wurde die RNeasy MinElute Spin Trennsäule in ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß gesetzt und mit 10 µl vorgewärmten (40°C) RNase freiem Wasser, das direkt in das Zentrum der Trennsäulenmembran pipettiert wurde, inkubiert. Anschließend wurde mit geschlossenem Deckel für 1 Min. bei 13 000 rpm zentrifugiert.

#### **4.10.3. Messung der RNA Konzentration**

Die RNA Konzentration wurde mit dem Nano Drop RNA Spektrophotometer gemessen. Das Spektralphotometer misst die Lichtabsorption von Proben in bestimmten Wellenlängenbereichen. Das Nano Drop RNA Photometer misst die Absorptionswerte voreingestellt bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 280$  nm. Die Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  und  $OD_{260}/OD_{230}$  bestimmen die Reinheit der RNA. Die Richtwerte liegen für  $OD_{260}/OD_{280}$  zwischen 1,8 und 2,0 und für  $OD_{260}/OD_{230}$  bei 1,8 oder höher. Nukleinsäuren werden bei  $\lambda = 260$  nm, Proteine, Salze und Lösungsmittel jedoch bei  $\lambda = 230$  nm und  $\lambda = 280$  nm detektiert. Hohe OD-Quotienten indizieren daher, dass reine RNA extrahiert wurde.

#### **4.10.4. Reverse Transkription**

Für die Reverse Transkription wurden 200 ng RNA verwendet, die mit der Moloney-Leukemia Virus (M-MLV) Reversen Transkriptase zu komplementärer DNA umgeschrieben wurden.



Die RNA wurde mit 2 µl Oligo dT, bei einem Gesamtvolumen von 18 µl, versetzt und für 10 Min. bei 70°C denaturiert. Die Probe wurde im Anschluss direkt auf Eis gesetzt, um weitere Reaktionen zu unterbinden. Der Reverse Transkription Master Mix wurde hergestellt, bei 42°C vorgewärmt und anschließend mit dem M-MLV Enzym versetzt. Folgend wurde die denaturierte RNA (18 µl) mit 12 µl des Reverse Transkription Master Mix (Tabelle 1) vermischt und umgeschrieben (Tabelle 2). Um den Erfolg der Reversen Transkription und die Qualität der umgeschriebenen cDNA zu validieren, wurde eine  $\beta$ -Actin-PCR durchgeführt. Die cDNA Proben wurden bei -20° gelagert.

<b>Reverse Transkription Master Mix (12 µl)</b>	
RNase freies H <sub>2</sub> O	2 µl
RT Puffer 5x	6 µl
dNTP	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	1 µl

**Tabelle 1: Reverse Transkription Master Mix.** Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Master Mixes für die Reverse Transkription.

<b>Inkubationsschritte Reverse Transkription</b>		
Aktion	Zeit	Temperatur
RNA Denaturierung	10 Min.	70°C
Die denaturierte RNA wurde auf Eis gestellt, bevor der RT Master Mix hinzugefügt wurde		
Reverse Transkription	75 Min.	42°C
Enzyminaktivierung	15 Min.	72°C

**Tabelle 2: Inkubationsschritte der Reversen Transkription.** Nach 10-minütiger Denaturierung bei 70°C, erfolgte die Reverse Transkription bei 42°C für 75 Min., gefolgt durch die Enzyminaktivierung über 15 Min bei 72°C.

#### 4.10.5. Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion, kurz PCR (engl. Polymerase Chain Reaction) dient der Amplifizierung von Nukleinsäuren. Durch die Verwendung des Enzyms DNA-Polymerase und den gezielten Einsatz spezifischer Oligonukleotid-Primer, die mit komplementären DNA-Abschnitten hybridisieren, können gewünschte Abschnitte der DNA vervielfältigt werden.

Die Proben wurden mit dem gewünschten PCR Master Mix (Tabelle 3) zusammen pipettiert und in dem PCR Thermozykler amplifiziert (Tabelle 4). Die entstandenen PCR-Produkte wurden direkt im Agarose Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese getrennt.

	<i>Qiagen</i>	<i>Andere</i>
RNase freies H <sub>2</sub> O	13,75 $\mu$ l	15,25 $\mu$ l
5x Go Taq Flexi Puffer	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
Forward Primer	-	0,5 $\mu$ l
Reverse Primer	-	0,5 $\mu$ l
Qiagen Primer Assay	2,5 $\mu$ l	-
Go Taq Polymerase	0,25 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l
cDNA Probe	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l

**Tabelle 3: Master Mix für PCR:** Die Tabelle zeigt die unterschiedliche Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für die PCR Reaktionsansätze für Qiagen Primer Assays (AR) und andere Primer ( $\beta$ -Aktin, Insl 3).

	$\beta$ -Aktin		Andere	
	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.
Initiale DNA Denaturierung	4 Min.	94°C	3 Min.	95°C
DNA Denaturierung	40 s	94°C	15 s	95°C
Primerhybridisierung	40 s	60°C	20 s	57,5°C
Elongation	40 s	72°C	60 s	72°C
Terminale Elongation	10 Min.	72°C	10 Min.	72°C

} 25x

**Tabelle 4: Programme des PCR Thermozyklers.** Übersicht der Programme des PCR Thermozyklers für  $\beta$ -Aktin und andere Primer, zu denen die für AR und Insl3, gehören.

#### 4.10.6. DNA Agarose Gel Elektrophorese

Zur Auftrennung der DNA Fragmente mittels Gelelektrophorese wurden 1 % Agarose Gele hergestellt. Dazu wurde Agarose in TAE Puffer in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle bei 500 Watt für 1 Min. durch Kochen gelöst. Nachdem die Agaroselösung auf eine Temperatur von ca. 60°C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid mit einer

Konzentration von 0,5 µg/ml zugefügt. Die Lösung wurde in eine Agarose Gel Form gegossen und ein passender Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde der Kamm entnommen. Das Gel wurde in eine mit 1xTAE Puffer gefüllte Elektrophorese Kammer gesetzt. Eine passende DNA-Leiter und die mit 1:6 DNA Probenpuffer versetzte PCR Reaktion wurden in die Taschen pipettiert und je nach Größe für 30 bis 60 Minuten eine Spannung von 100 V (2-10 V/cm Gel) angelegt. Die PCR Produkte wurden unter einem UV Imaging System visualisiert und mit einem Gel Dokumentationssystem fotografiert.

#### **4.11. Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)**

Die qRT-PCR besitzt neben der Amplifizierung, die Möglichkeit der Quantifizierung von DNA Proben. Letztere wird durch den Einsatz von Echtzeit-Fluoreszenz-Messungen erreicht.

Hierzu werden Fluoreszenz Farbstoffe genutzt, welche in die DNA interkalieren. Ein geeigneter Farbstoff ist SYBR Grün I. SYBR Grün I ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der doppelsträngige DNA bindet. Der entstehende DNA-SYBR-Grün I-Komplex absorbiert blaues Licht der Wellenlänge  $\lambda = 494 \text{ nm}$  und emittiert grünes Licht der Wellenlänge  $\lambda = 521 \text{ nm}$  (Zipper et al. 2004). Der exponentielle Anstieg der gefärbten amplifizierten DNA resultiert in einer dazu korrelierenden Zunahme der Fluoreszenz, welche in Echtzeit (engl. Real-Time) in jedem Zyklus stets am Ende der Elongation gemessen wird. Die Menge der zu untersuchenden cDNA Matrize entscheidet über die erforderliche Zyklusanzahl. Je höher die Kopienzahl der cDNA Matrize, desto geringer ist die benötigte Zyklusanzahl bis das Fluoreszenz Signal den Schwellenwert erreicht. Die Anzahl der Zyklen bis zum Überschreiten des Schwellenwertes, wird als Ct-Wert (engl. Cycle Threshold) bezeichnet und markiert den Anfang der exponentiellen Phase. Im Anschluss an jede qRT-PCR wurde eine Schmelzkurve erstellt, um sicherzustellen, dass nur ein spezifisches Amplifikat durch die Primer gebildet wurde. Bei stetig ansteigenden Temperaturen von 50°C bis 100°C wird die Fluoreszenzintensität der Proben gemessen. Es kommt zur Denaturierung der Amplifikate auf Grund der Temperaturerhöhung und folglich zu einer Fluoreszenzabnahme. Die Schmelzkurve erhält man durch das Auftragen von  $-dF/dT$  (wobei d, delta = Ableitung, F = Fluoreszenzintensität, T = Temperatur) gegen die Temperatur. Die im Anschluss angefertigte Schmelzkurve sollte nur einen Scheitelpunkt aufweisen, was für die Spezifität der Primer und somit für die

Amplifikation nur eines Produktes spricht. Die Schmelzkurvenanalyse wird somit zur qualitativen Validierung des PCR-Produktes genutzt.

Abgesehen von dem DNA-Fluoreszenz Farbstoff und dem Fluoreszein unterscheiden sich die Reagenzien wenig von der normalen PCR. Zur Durchführung der qRT-PCR wurde das QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit von Qiagen verwendet. Es enthält eine HotStartTaq® DNA Polymerase, SYBR Green, einen dNTP und dUTP Mix und 5 mM MgCl.

	Qiagen	Andere
cDNA	1	1
2 x SYBR Green Supermix (Qiagen)	12,5	12,5
Forward Primer	-	1
Reverse Primer	-	1
QuantiTect Primer	2,5	-
Fluoreszein (1:4)	1	1
H <sub>2</sub> O	8	8,5
<b>Total</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl</b>

**Tabelle 5: Master Mix für qRT-PCR.** Zu den QuantiTect Primer Assays von Qiagen zählen 18s RNA,  $\beta$ -Aktin, CD80, CD86, IL-6 und PGK-1. Zur Spalte „Andere“ zählen  $\beta$ 2-Mikroglobulin,  $\beta$ -Aktin, IL-10 und MCP-1.

Die cDNA Proben der behandelten TM wurden auf Eis gelegt und die jeweiligen Proben mit dem Master Mix in eine 96-Multiwell-Platte pipettiert (Tabelle 5). Anschließend wurde die qRT-PCR im iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System durchgeführt (Tabelle 6).

Zyklus	Temperatur	Zeit
1	95°C	15 Min.
45 Zyklen	94°C	15 Sek.
	55°C	30 Sek.
	72°C	30 Sek.
1	50°C	10 Sek.

**Tabelle 6: Programm für qRT-PCR.** Übersicht des Programms des iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection Systems für die Detektion von 18s RNA,  $\beta$ -Aktin, CD80, CD86, IL-6, IL-10, MCP-1 und PGK-1.

#### 4.11.1. Berechnung der relativen Expression gesuchter Zielgene

Der Vergleich der Quantifizierung von mRNA Transkripten mittels qRT-PCR ist stark abhängig von der Variation zwischen der Menge des Ausgangsmaterials der einzelnen Proben. Starke Variationen können zu Fehlinterpretationen der Expressions-Profile der Zielgene führen. Dementsprechend muss nach einer Möglichkeit gesucht werden, hieraus entstehende Fehler zu minimieren. Dazu wird gleichzeitig mit dem Zielgen eine zelluläre RNA amplifiziert, die als interne Referenz dient, gegen welche die weiteren RNA Werte normalisiert werden können (Thellin et al. 1999). Diese interne Referenz sollte möglichst wenig reguliert und auf einem konstanten Level in allen Proben unabhängig von experimentellen Bedingungen exprimiert werden. Meist werden sogenannte Housekeeping-Gene als interne Referenz genutzt (Bustin 2000). Um ein geeignetes Housekeeping-Gen zu finden, dessen Expression bei der Behandlung von TM mit LPS und Testosteron konstant blieb, erfolgte die Untersuchung von 18s rRNA, PGK-1 (Phosphoglyceratkinase-1),  $\beta$ 2-Mikroglobulin und  $\beta$ -Aktin als mögliche Kandidatengene. Die Vorversuche zeigten, dass  $\beta$ 2-Mikroglobulin die geringsten Schwankungen bei den Behandlungen aufwies, sodass es für alle folgenden Experimente als Housekeeping-Gen gewählt wurde.

Zur Berechnung der Expression der Zielgene im Vergleich zum Housekeeping-Gen sind verschiedene mathematische Modelle etabliert (Tichopad et al. 2004). Die Berechnung beruht auf dem Vergleich bestimmter Zykluspunkte, wie z.B. den crossing points (CP, Kreuzpunkten) oder den Schwellenwerten (Ct-Werten). In dieser Arbeit wurden die Ct-Werte zur Berechnung der relativen Expression genutzt (Livak & Schmittgen 2001). Für jede Probe wurden sowohl die Ct-Werte des Zielgens als auch des Housekeeping-

Gens bestimmt und die relative Expression (RE) wie folgt berechnet:

$$RE = 2^{-[\Delta Ct_{C0} - \Delta Ct_{Probe}]}$$

wobei  $C_0$  für die Kontrolle (nicht behandelte Zellen) steht. Es gilt  $\Delta Ct = Ct_{Zielgen} - Ct_{\beta 2\text{-Mikroglobulin}}$ .

#### **4.11.2. Durchführung einer Verdünnungsreihe zur Kalkulation der Primereffizienz**

Zur Prüfung der eingesetzten Primer (CD80, CD86) und zur Bestätigung der Genauigkeit des Arbeitens unter der Sterilbank und des Pipettierens, wurde die Amplifikation von Verdünnungsreihen (1:1, 1:10, 1:100) der cDNA mit bestimmten Primern untersucht. Jede Probe wurde stets als Duplikat untersucht, um die Intraassay-Varianz zu bestimmen. Die Durchführung einer Verdünnungsreihe und die Kalkulation der Effizienz, ist dem Ergebnisteil zu entnehmen.

### **4.12. Intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentrationsmessung**

#### **4.12.1. Vorbereitung der Zellen zur intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentrationsmessung**

Die isolierten TM wurden genutzt, um die Veränderungen der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen nach Stimulation mit Testosteron zu messen.

Frisch isolierte TM wurden mit 1  $\mu$ l Fura-2AM für 40 Min. bei 34°C in 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES) Puffer (siehe 2.10.) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten in HEPES Puffer gewaschen. Folgend wurden die mit TM behafteten Coverslips auf eine delta-T Schale gelegt und auf dem mit einem Monochromator verbundenem Olympus Mikroskop befestigt.

#### **4.12.2. Bilder und Analyse mit dem Tillvision Kamera und Software System**

Die Bilder wurden mit einem digitalen Langzeit-Belichtungs-Kamera-System aufgenommen. Für die Erfassung und Analyse der Bilder wurde die Tillvision Software 2.0 genutzt.

Die Veränderung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration wurde nach Stimulation mit 10, 100 und 1000 nM Testosteron gemessen, indem alle 2 Sekunden Fotos aufgenommen wurden. Als Positivkontrolle der Reaktionsfähigkeit der Zellen diente

ATP in einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  in HEPES Puffer. Alle Experimente wurden bei 34°C durchgeführt.

Fura-2AM ist ein radiometrischer Fluoreszenzfarbstoff, der durch UV-Licht einer Wellenlänge von 340 nm bis 380 nm angeregt und bei  $\lambda \sim 510$  nm gemessen wird. Die Zellen wurden einzeln ausgewählt, bei  $\lambda = 340$  nm und 380 nm für 20 ms stimuliert und der Quotient des Emissions Signals ( $\lambda \sim 510$  nm) aus beiden Stimuluswellenlängen (340nm/380nm) gebildet und dokumentiert.

Zur Analyse wurden mittels der radiometrischen Daten Graphen dargestellt, die die Veränderung in der Fluoreszenz F1/F0 zeigen. Hierbei repräsentiert F0 die Fluoreszenz zu Beginn und F1 die Fluoreszenz eines bestimmten Zeitpunktes. Die Quotienten aus der Fluoreszenz 340nm/380nm wurden auf 100% normalisiert und als Mittelwert  $\pm$  SEM (engl. Standard Error of the Mean = Standardfehler) von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

#### **4.13. Experimentelle Autoimmun-Orchitis (EAO)**

Das Verfahren zur Induktion einer EAO ist im Labor der AG Meinhardt etabliert und wurde wie in vorigen Arbeiten bereits beschrieben, durchgeführt (Fijak et al. 2011).

#### **4.14. Statistische Analyse**

Die Balkendiagramme werden als Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Der statistische Vergleich der relativen mRNA-Expression von CD86, CD80, MCP-1, IL-6 und IL-10 nach Behandlung von TM mit Testosteron und LPS wurde mit dem One-Way ANOVA Test, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test, durchgeführt. Jegliche statistischen Tests wurden mit der Software GraphPad Prism 7.02 berechnet.

---

## 5. Ergebnisse

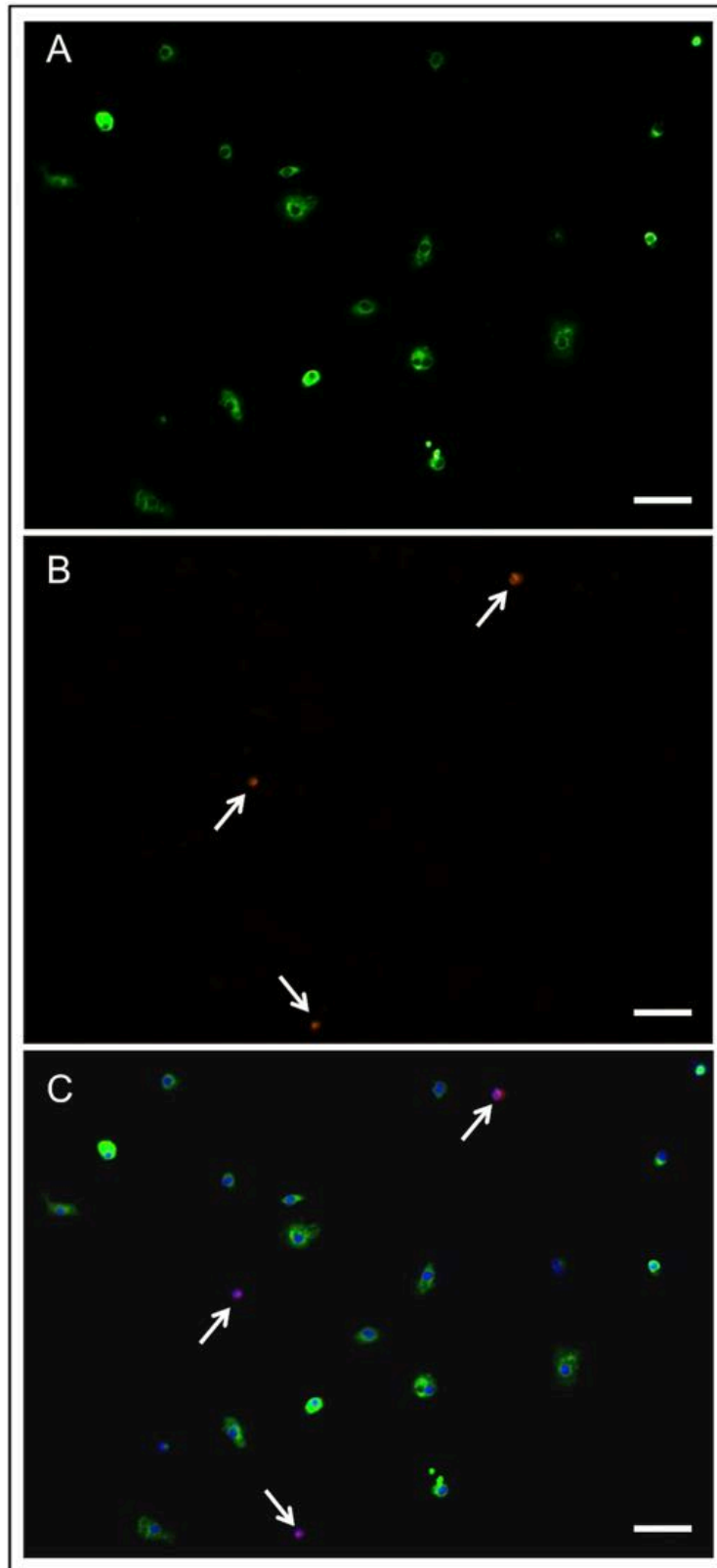
---

### 5.1. Reinheitsbestimmung der isolierten testikulären Makrophagen

Zur Verifizierung der Reinheit der isolierten TM, wurde diese morphologisch durch IF-Darstellung von den Makrophagen-Markern ED1 (Antikörper gegen das lysosomale Membran Glykoprotein CD68) und ED2 (Antikörper gegen das Zelloberflächenglykoprotein CD163) sowie dem AR ermittelt (Abbildung 9). Zur Berechnung der Reinheit wurde die Anzahl von ED1 und ED2 positiven Zellen auf 100 Zellen ausgezählt.

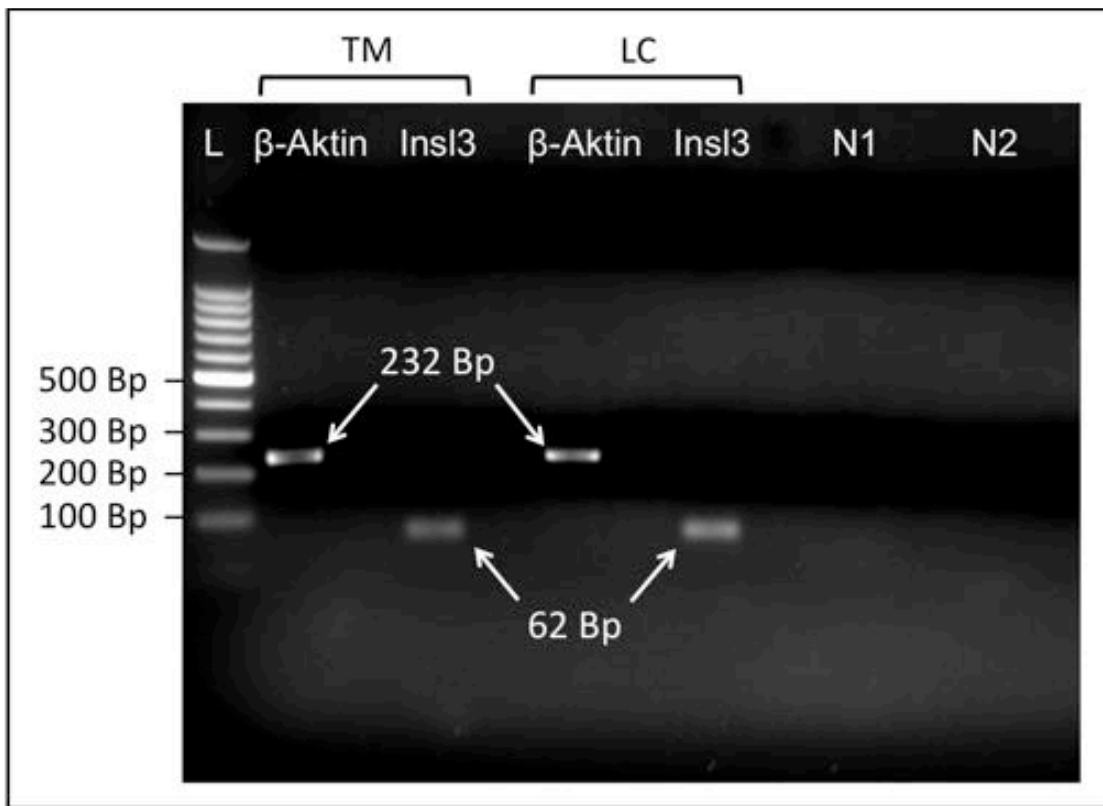
Die Reinheit betrug 85-90%. Der Großteil der kontaminierenden Zellen zeigte sich positiv anfärbbar für den AR (Abbildung 9 Pfeile), was auf eine geringgradige Kontamination mit LC hindeutete.





**Abbildung 9 Reinheitsbestimmung der Population isolierter TM.** Doppel-IF-Färbungen von isolierten TM mit monoklonalen Antikörpern gegen die Glykoproteine CD68 (ED1, FITC, grün) und CD163 (ED2, FITC, grün) sowie polyklonalen Antikörpern gegen den AR (Cy3, orange). Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Abbildung A (ED1, ED2) und B (AR) zeigen die einzelnen Farbstoffe, während C das Overlay von ED1 und ED2 (FITC) kombiniert sowie dem AR (Cy3) zeigt. Bei den kontaminierenden Zellen (Pfeile) handelt es sich primär um AR-positive Zellen. Die Skalierungsleiste entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

Um eine mögliche LC-Kontamination zu prüfen, wurde die Population von isolierten TM mittels PCR auf die Expression des LC spezifischen Markers InsI3 (Insulin like 3) untersucht.



**Abbildung 10: Nachweis der Expression des Leydig Zell-spezifischen Transkript InsI3 in isolierten testikulären Makrophagen und isolierten Leydig Zellen.** Untersuchung isolierter TM und LC auf die Expression des LC spezifischen Transkripts InsI3 mittels PCR. Die erfolgreiche Reverse Transkription bestätigen die vorhandenen PCR-Produkte für β-Aktin (232 Bp). Sowohl die TM- als auch die LC-Proben sind für InsI3 (62 Bp) positiv, was für eine Kontamination der isolierten TM durch LC spricht. L: Leiter, N1: Negativkontrolle β-Aktin, N2: Negativkontrolle InsI3. TM = testikuläre Makrophagen, LC = Leydig Zellen, Bp = Basenpaare.

In der PCR Untersuchung zeigte sich eine schwache Bande für das Amplifikationsprodukt von InsI3 (62 Bp) in den isolierten TM, was eine diskrete Kontamination isolierter TM durch LC bestätigte (Abbildung 10). Diese Kontamination wurde bei der Bewertung und Interpretation aller weiteren Ergebnisse berücksichtigt.

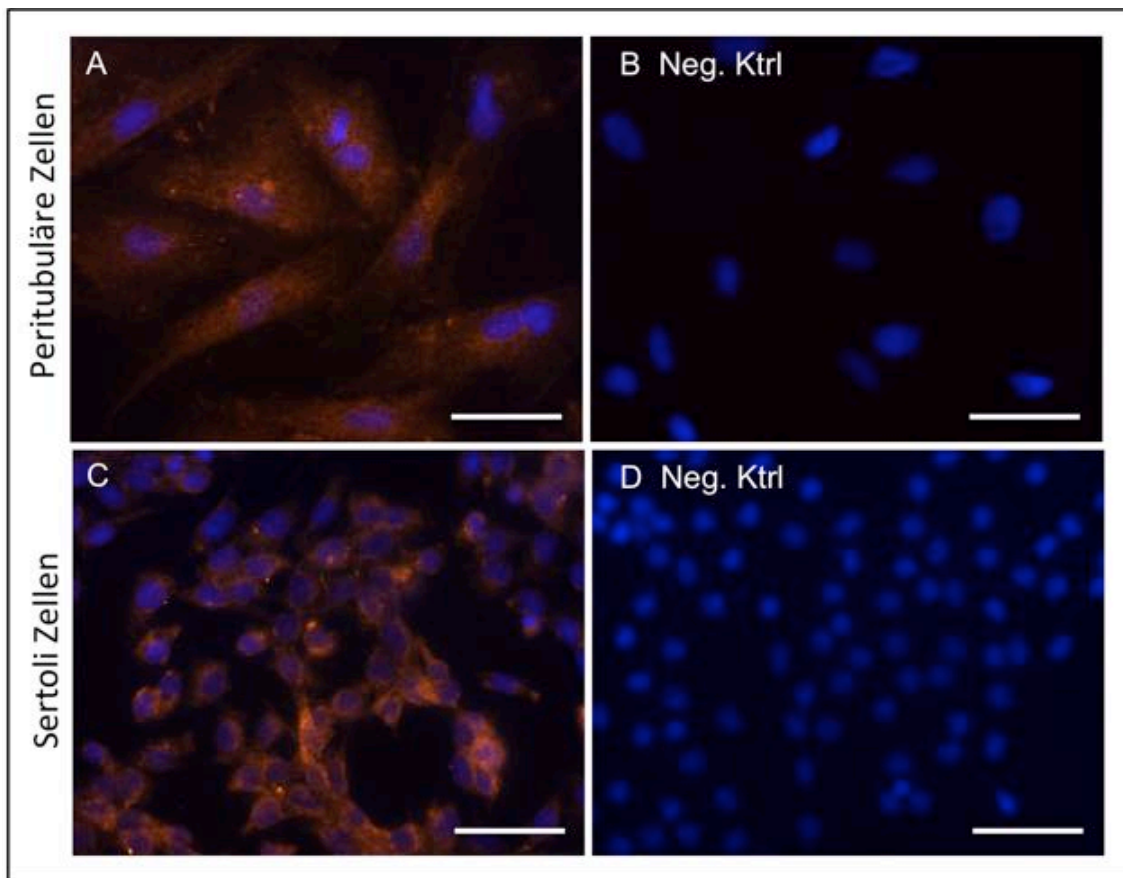
## 5.2. Der Androgen Rezeptor konnte nicht in testikulären Makrophagen nachgewiesen werden

Bis dato sind drei Signalwege beschrieben, über die Testosteron Zellen aktivieren kann (Walker 2011). Der klassische Testosteron-Signalweg und der nicht-klassische Kinasen-Signalweg werden über den AR vermittelt, während der nicht-klassische  $\text{Ca}^{2+}$ -

Influx-Signalweg über einen membranständigen G-Protein-gekoppelten-Rezeptor induziert wird (Smith & Walker 2014). Im ersten Schritt wurde untersucht, ob TM den AR exprimieren. In weiteren Versuchen wurden der nicht-klassische Kinasen- und der nicht-klassische  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg in TM untersucht.

### 5.2.1. Untersuchung der Androgen Rezeptor-Expression mittels Immunfluoreszenz

Zum Nachweis der Sensitivität und Spezifität des eingesetzten polyklonalen Kaninchen anti-Ratte Antikörpers gegen den AR wurden IF Färbungen von primären SC und PTC als etablierte Positivkontrolle durchgeführt.



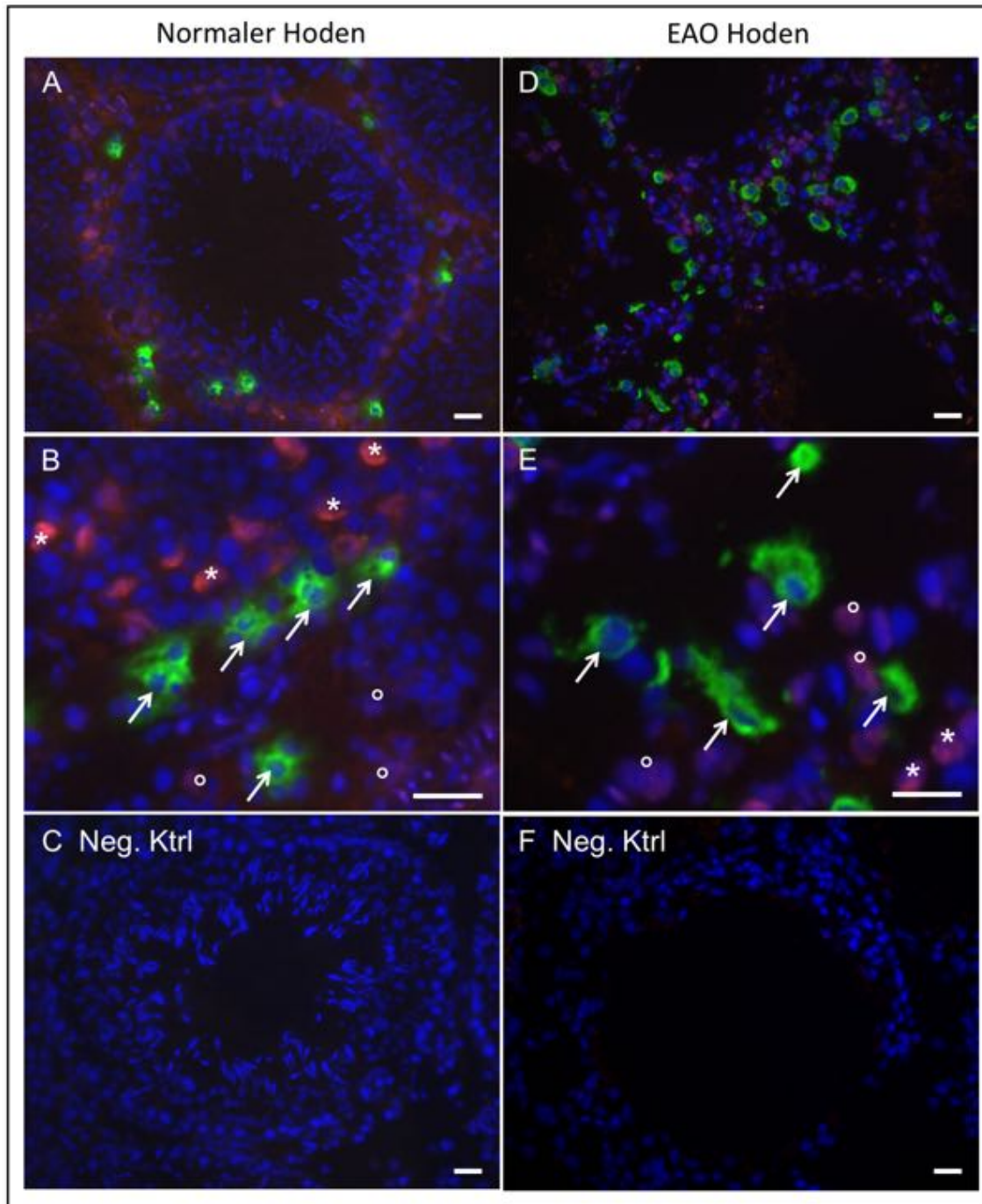
**Abbildung 11: Expression des Androgen Rezeptors in primären peritubulären und Sertoli Zellen.** IF-Darstellung des AR (Cy3, orange) in isolierten PTC (A) und SC (C) aus Rattenhoden. Die IF-Färbung zeigt die Präsenz des AR in der großen Mehrzahl der Zellen. Die Markierung ist zumeist zytoplasmatisch, in einigen Zellen darüber hinaus auch im Zellkern. Sowohl PTC (B) als auch SC (D), die anstatt mit dem Erstantikörper nur mit PBS inkubiert wurden, zeigten keine unspezifische Färbung (Neg. Ktrl = Negativkontrolle). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Skalierungsleiste entspricht 50 µm.

Die Expression des AR in SC und PTC konnte in der vorliegenden Arbeit, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde (Vornberger et al. 1994; Zhou et al. 2002), mittels IF-Färbungen bestätigt werden (Abbildung 11).

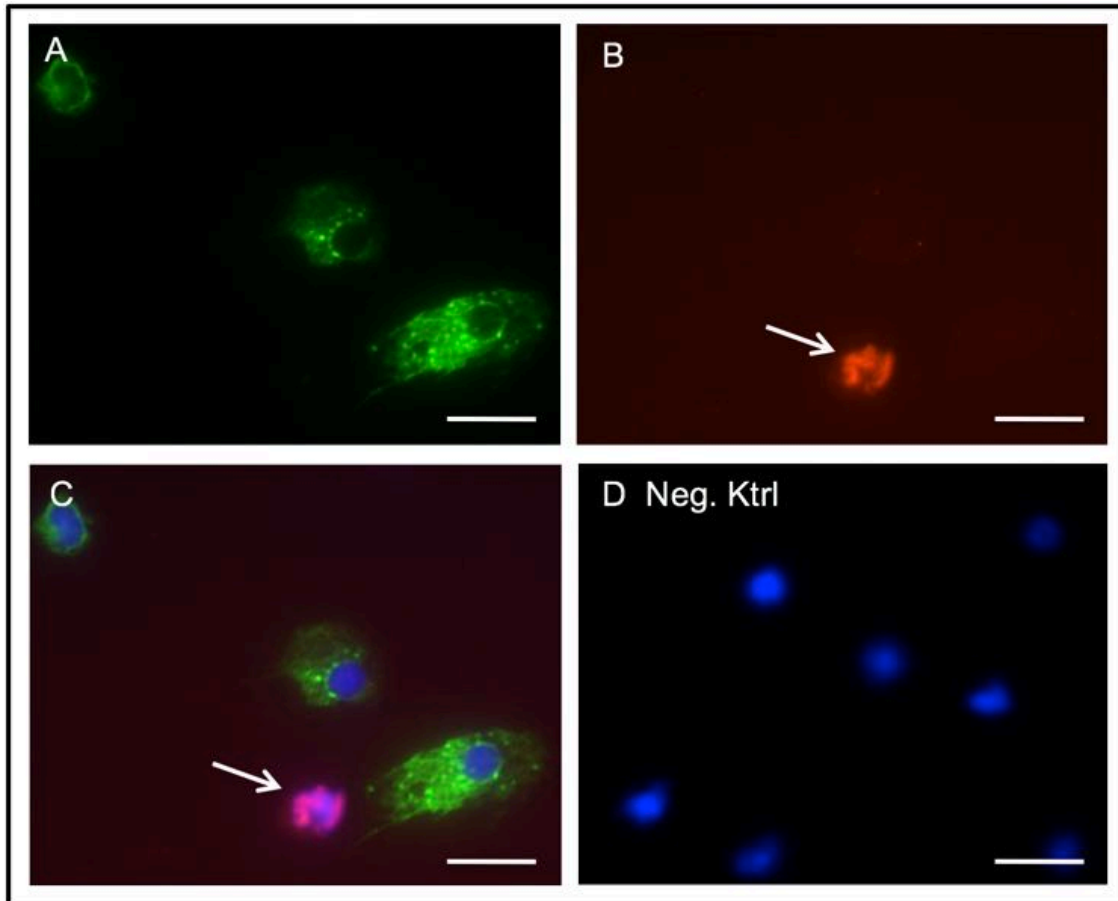
Dies bestätigte die Spezifität des verwendeten Antikörpers, sodass dieser für die weiteren Experimente an TM verwendet werden konnte.

Die Expression des AR wurde sowohl an Schnitten des Rattenhodens (Abbildung 12) als auch an isolierten primären TM (Abbildung 13) mittels IF untersucht. Dazu wurden Doppel-IF-Färbungen mit Antikörpern gegen den AR sowie ED1 und ED2 durchgeführt.

Im normalen Hoden konnte der AR in den interstitiellen LC, allerdings nicht in den im Interstitium ebenfalls vorkommenden TM detektiert werden (Abbildung 12 A, B). Die basal in den Tubuli seminiferi gelegenen SC sowie PTC zeigten die bekannte positive Färbung für den AR (Abbildung 12 A, B) (Vornberger et al. 1994). Der Vergleich von normalen Hoden mit den EAO-Hoden deutete auf eine höhere Anzahl der sich im Interstitium befindenden TM, von denen alle keine AR-Expression zeigten (Abbildung 12 E). Des Weiteren konnte der AR nicht in isolierten TM detektiert werden (Abbildung 13 A, B). Bei diesen wurde jedoch eine schwache Kontamination mit LC, die den AR exprimieren (markiert als \* in Abbildung 13 A, B) festgestellt.



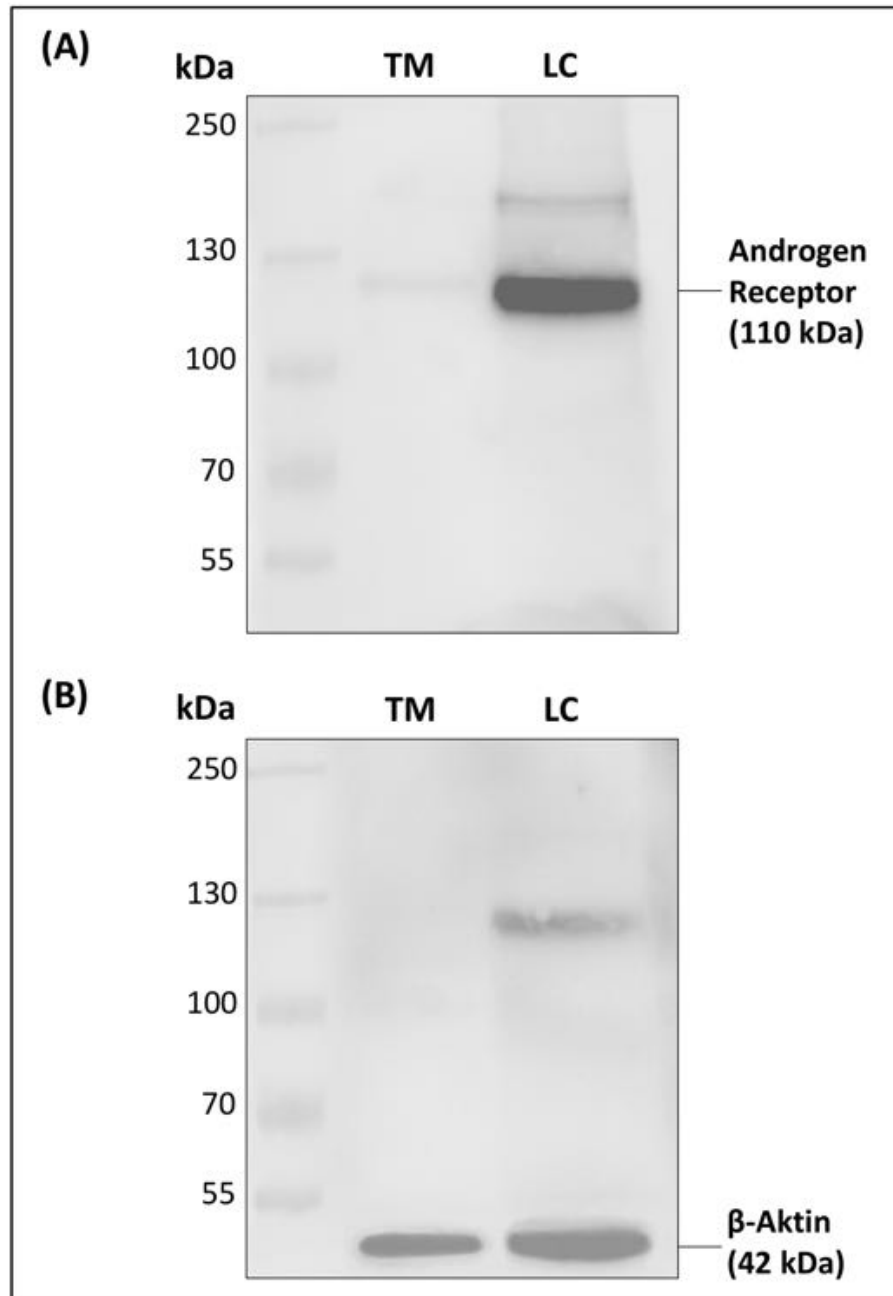
**Abbildung 12: Die Expression des AR in testikulären Makrophagen ist im normalen und EAO Hoden nicht detektierbar.** Doppel-IF Färbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen die Glykoproteine CD68 (ED1, FITC, grün) und CD163 (ED2, FITC, grün) sowie polyklonalen Antikörpern gegen den AR (Cy3, orange) auf Kryostatschnitten von normalen und EAO Hoden der Ratte. Das Anfärben der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der AR konnte nicht in den im Interstitium lokalisierten TM (siehe Pfeile) detektiert werden. Hingegen war eine andere interstitielle Zellpopulation positiv anfärbbar für den AR. In Bezug auf die Anzahl und Verteilung handelt es sich hierbei am wahrscheinlichsten um LC (siehe °). Deutlich sichtbar ist eine AR positive Färbung in den basal sitzenden SC der Tubuli seminiferi (siehe \*). In den EAO-Hoden erscheint die Anzahl der TM erhöht (D, E). Es konnte keine positive Färbung in der Negativkontrolle detektiert werden (C, F). Die Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. Die Skalierungsleiste entspricht 25  $\mu$ m. EAO = Experimentelle Autoimmun-Orchitis; Neg. Ktrl = Negativkontrolle.



**Abbildung 13 Die Expression des AR ist in isolierten testikulären Makrophagen nicht detektierbar.** Doppel-IF Färbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen die Glykoproteine CD68 (ED1, FITC, grün) kombiniert mit CD163 (ED2, FITC, grün) sowie einem polyklonalen Antikörper gegen den AR (Cy3, orange) an isolierten TM. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Abbildung A (FITC, grün) demonstriert die Färbung von ED1 und ED2, Abbildung B (Cy3, orange) zeigt die Färbung vom AR, während C das Overlay von ED1, ED2 und dem AR darstellt. Der AR lässt sich mittels IF nicht in den isolierten TM detektieren. Bei der AR-positiven Zelle (Pfeil) handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine geringgradige Kontamination mit LC. Es konnte keine positive Färbung in der PBS-Negativkontrolle detektiert werden (D). Die Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. Die Skalierungsleiste entspricht 25  $\mu\text{m}$ . Neg. Ktrl = Negativkontrolle

### 5.2.2. Untersuchung der Androgen Rezeptor-Expression mittels Immunoblot

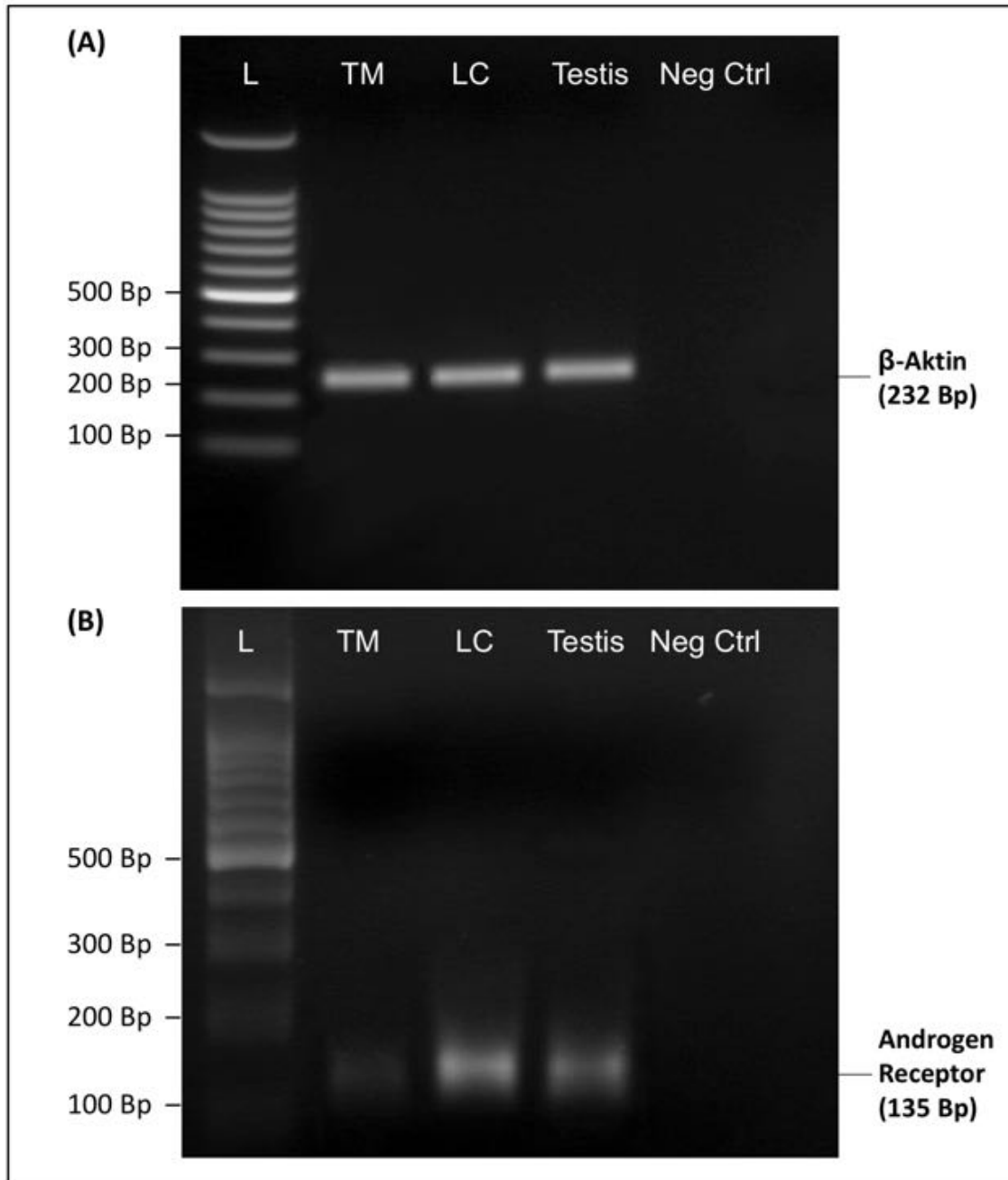
Darüber hinaus wurde die Präsenz des AR in TM auf Proteinebene im Immunoblot Verfahren untersucht. Als Positivkontrolle dienten aus Rattenhoden isolierte LC, welche den AR (110 kDa) aufweisen (Zhou et al. 2002). Im Immunoblot zeigte sich keine Bande (110 kDa) für den AR in den TM (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Kein Nachweis der AR-Expression in testikulären Makrophagen im Immunoblot.** Zelllysate von isolierten TM und LC wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend mit primären Antikörpern gegen AR (1:700) und  $\beta$ -Aktin (1:4000) ü.N. bei 4°C inkubiert. Für die Detektion des AR und von  $\beta$ -Aktin wurde der sekundäre anti-Kaninchen IgG Antikörper konjugiert mit Meerrettich Peroxidase verwendet (1:1000 für AR; 1:10000 für  $\beta$ -Aktin). Das Signal wurde mit SuperSignal® ECL Substrat sichtbar gemacht. Es ist keine Bande für den AR in TM bei 110 kDa sichtbar (A), während LC eine starke AR-Expression aufweisen (B). Die Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. TM = testikuläre Makrophagen, LC = Leydig Zellen, AR = Androgen Rezeptor.

### 5.2.3. Untersuchung mittels PCR

Nach der Untersuchung von TM auf das Vorhandensein des AR im Immunoblot folgte eine weitere Analyse mittels PCR. Hier wurde kein Transkript für den AR (135 Bp) in TM detektiert. Dagegen waren die AR Amplifikate in LC und Rattenhoden sichtbar (Abbildung 15 A, B).

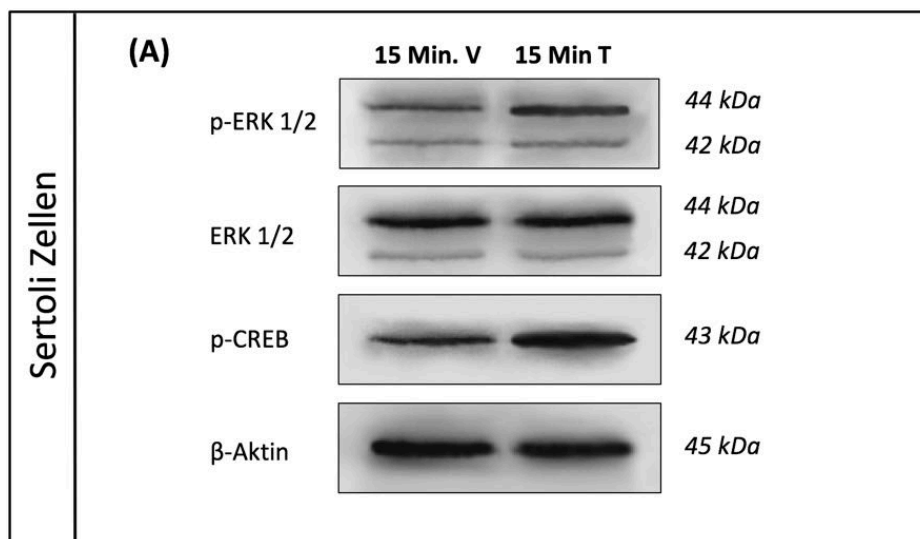


**Abbildung 15: Kein Nachweis für die AR mRNA-Expression in testikulären Makrophagen mittels PCR.** TM wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des AR Transkripts analysiert. Als Positivkontrolle dienten LC und Hoden cDNA. (A) Die Reverse Transkription war für alle Proben erfolgreich und zeigt gleichmäßig intensive Banden für  $\beta$ -Aktin (232 Bp) in allen drei Proben. (B) TM zeigen kein AR Transkript. Hingegen ist das Amplifikationsprodukt des AR (135 Bp) in LC und Rattenhoden stark exprimiert. Bp = Basenpaare, L = DNA Leiter, LC = Leydig Zellen, Neg Ctrl = Negativkontrolle, TM = Testikuläre Makrophagen.



### 5.3. Eine Stimulation von testikulären Makrophagen mit Testosteron bewirkt keine Induktion der Phosphorylierung von ERK und CREB

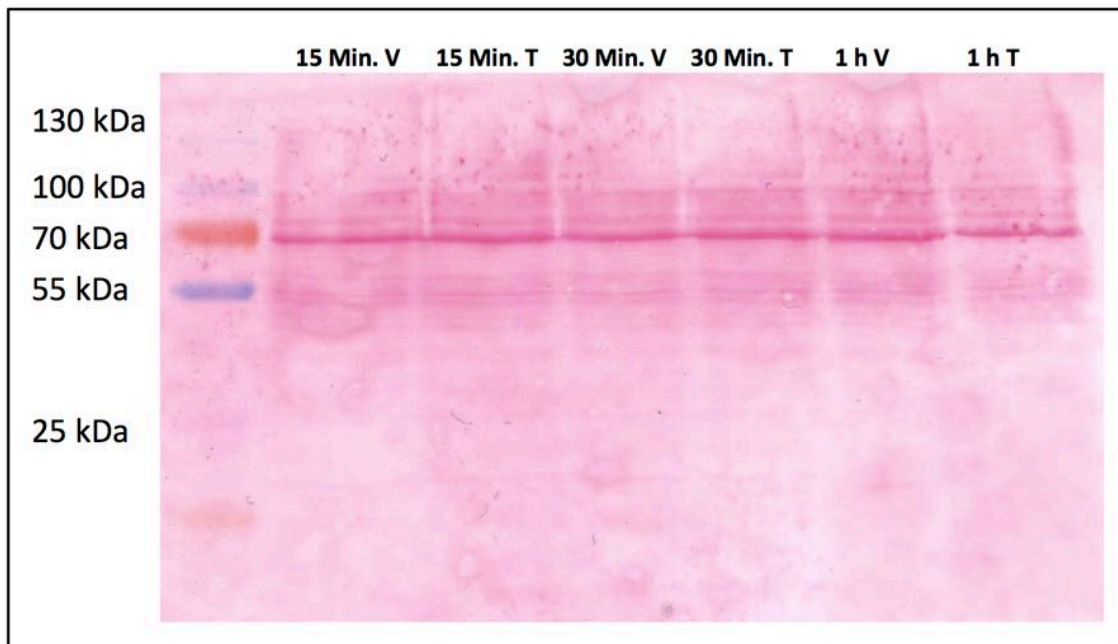
Im Anschluss wurde die Testosteron vermittelte Aktivierung des nicht-klassischen Kinasen-Signalweges durch Induktion der Phosphorylierung von ERK (extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen) und CREB (cAMP response element-binding protein) im Immunoblot Verfahren untersucht. Als Positivkontrolle für den nicht-klassischen Kinasen-Signalweg dienten SC, welche für 15 Min. mit 100 nM Testosteron stimuliert wurden.



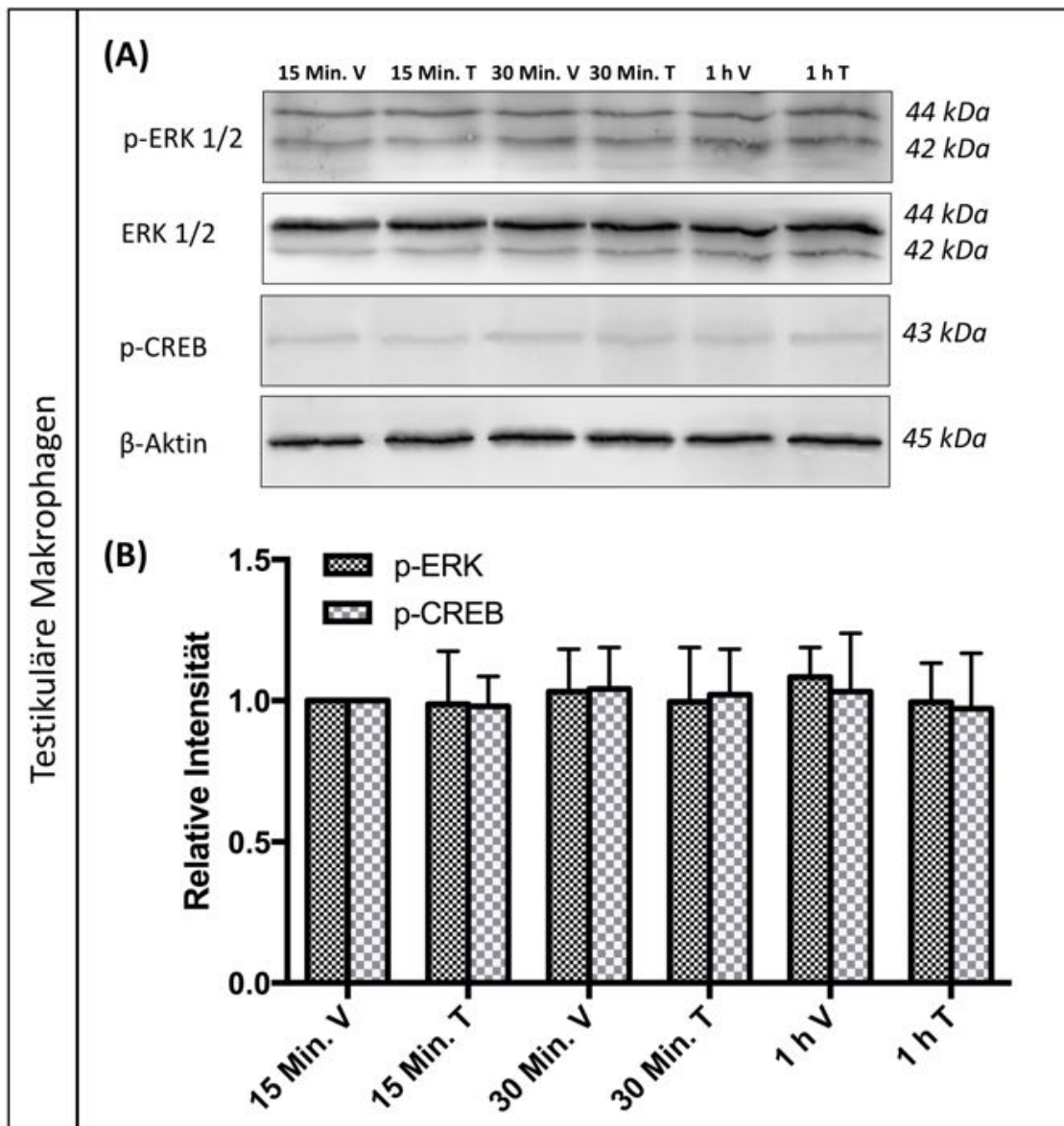
**Abbildung 16: Eine Testosteron-Behandlung führt zu einer Induktion der Phosphorylierung von ERK und CREB in Sertoli Zellen.** (A) SC wurden für 15 Min. entweder mit Vehikel (98% Ethanol) oder 100 nM Testosteron inkubiert. Das Zelllysate wurde einer Immunoblot Analyse mit Antikörpern gegen total ERK 1/2 (1:1000), phosphoryliertes (p)-ERK 1/2 (1:1000), p-CREB (1:1000) und β-Aktin (1:2000) unterzogen. Als sekundärer Antikörper diente ein IgG Antikörper konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (1:10000). Das Signal wurde mit ECL Substrat sichtbar gemacht. Die Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten. V = Vehikel, T = Testosteron.

Die Stimulation von SC mit 100 nM Testosteron führte zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen-Signalkaskade mit einem im Immunoblot sichtbaren Anstieg der Phosphorylierung von ERK 1/2 und CREB (Abbildung 16).

Folgend wurde untersucht, ob in TM gleichermaßen wie bei den SC der nicht-klassische Kinasen-Signalweg durch Testosteron induzierbar war. Dazu wurden isolierte TM für 15, 30 und 60 Min. jeweils mit Vehikel (98% Ethanol) oder 1000 nM Testosteron behandelt und im Anschluss die Phosphorylierung von ERK und CREB mittels Immunoblot untersucht (Abbildung 17+18).



**Abbildung 17: Ponceau S Färbung zum Nachweis des erfolgreichen Protein Transfers.** Die Membran zeigt die Färbung der transferierten Proteine nach dem semi-dry Blotting Verfahren. TM wurden für 15, 30 und 60 Min. mit Vehikel (98% Ethanol) oder 1000 nM Testosteron inkubiert. Links im Bild ist der Proteinmarker zu erkennen, rechts davon die einzelnen in der SDS PAGE aufgetrennten Proben.



**Abbildung 18: Eine Testosteron-Behandlung führt nicht zu einer Induktion der Phosphorylierung von ERK und CREB in testikulären Makrophagen.** (A) TM wurden für 15, 30 und 60 Min. mit Vehikel (98% Ethanol) oder 1000 nM Testosteron inkubiert. Das Zelllysate wurde einer Immunoblot Analyse mit Antikörpern gegen total ERK 1/2 (1:1000), phosphoryliertes (p)-ERK 1/2 (1:1000), p-CREB (1:1000) und β-Aktin (1:2000) unterzogen. Als sekundärer Antikörper diente ein IgG Antikörper konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (1:10000). Das Signal wurde mit SuperSignal® ECL Substrat sichtbar gemacht. (B) Für die Quantifizierung der Blots wurde p-ERK zu ERK und p-CREB zu β-Aktin normalisiert. Die relative Intensität von 15 Min. Vehikel wurde auf 1,0 gesetzt und alle weiteren Messungen hierzu normalisiert. Es zeigt sich keine verstärkte Phosphorylierung von p-ERK 1/2 und p-CREB nach Behandlung mit Testosteron gegenüber Vehikel. Die Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. V = Vehikel, T = Testosteron.

Es konnte keine Induktion des nicht-klassischen Kinasen-Signalweges durch Testosteron in TM nachgewiesen werden. Die Behandlung von TM mit 1000 nM Testosteron führte an keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK oder CREB (Abbildung 18).

#### **5.4. Eine Stimulation von testikulären Makrophagen mit Testosteron bewirkt keinen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration**

Um den Einfluss von Testosteron auf TM über den nicht-klassischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg zu untersuchen, wurde eine Messung intrazellulärer freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nach Applikation von Testosteron durchgeführt.

TM wurden mit 10, 100 oder 1000 nM Testosteron stimuliert. Im Anschluss wurde der Anstieg der intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch Bestimmung des Fura-2AM Quotienten bei 340/380 nm gemessen. Als Positivkontrolle wurden die TM im Anschluss an die Testosteron Gabe mit 300  $\mu\text{M}$  Adenosintriphosphat (ATP) stimuliert. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Kumulativ aus den drei Versuchen wurde für die Stimulation mit 10 nM T eine Gesamtzellzahl von 57 TM (Abbildung 19 A), für 100 nM von 127 TM (Abbildung 19 B) und für 1000 nM von 75 TM (Abbildung 19 C) untersucht.

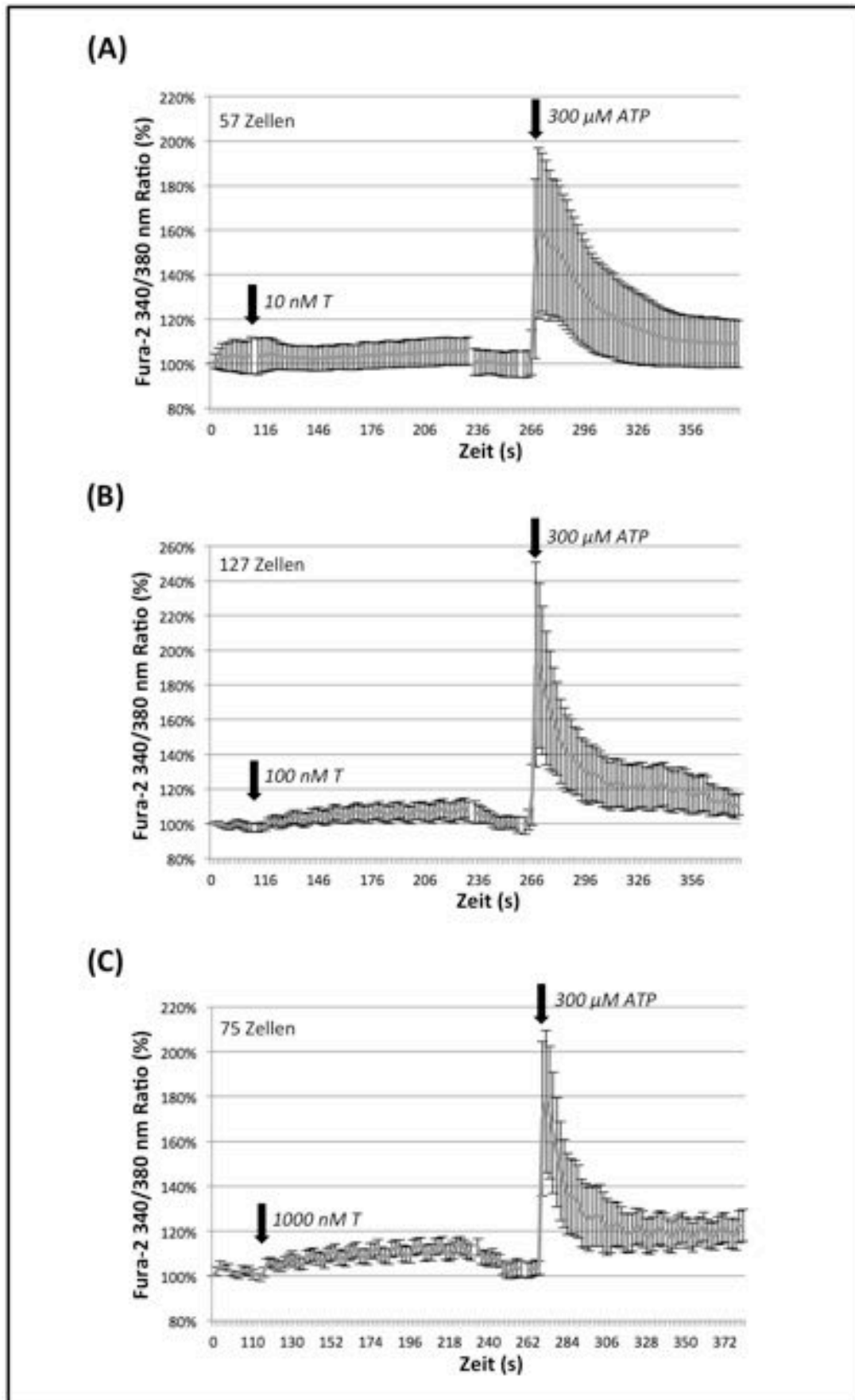


Abbildung 19: Eine Testosteron-Behandlung führt zu keinem Anstieg des intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$  in testikulären Makrophagen. TM wurden mit 10 nM (a), 100 nM (b) oder 1000

nM (c) Testosteron und im Anschluss mit jeweils 300  $\mu$ M ATP stimuliert. Die Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde als Quotient der Fura-2AM Fluoreszenzemission bei Stimulation mit 340/380 nm gemessen und als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Vor der Stimulation mit Testosteron und ATP wurden die Zellen mit HEPES Puffer (Vehikel) inkubiert, was in den Graphen als Fluoreszenzintensität von 100% normalisiert wurde. Keine der Stimulationen mit Testosteron (10, 100, 1000 nM) zog einen signifikanten Anstieg der intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach sich. Die prinzipielle Reaktionsfähigkeit der Zellen ist durch den rapiden Kurvenanstieg nach Applikation von ATP zu erkennen. Die Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. s = Sekunden, T = Testosteron.

Der Anstieg von Fura-2AM- $\text{Ca}^{2+}$  wird als signifikant angesehen, wenn zum einen der Anstieg höher als 10% ist und zum anderen der Graph nahe der Baselinie zurückkehrt. Nach Stimulation mit Testosteron zeigte sich eine Schwankung, die nicht als signifikanter Anstieg gewertet werden kann (Abbildung 19). Solche Fluktuationen kommen physiologisch in allen Zelltypen vor. Hingegen ist nach der Stimulation mit ATP ein sofortiger, signifikanter Anstieg von mehr als 10% sichtbar, welcher graduell zur Baselinie zurückkehrt und somit die Reaktionsfähigkeit der TM belegt (Abbildung 19).

## 5.5. Behandlung testikulärer Makrophagen mit LPS und Testosteron

Testosteron wird zunehmend eine entzündungshemmende Eigenschaft zugeschrieben (Haider et al. 2010; Nussinovitch & Shoenfeld 2012; Klein 2012). Durch eine einstündige Vorbehandlung mit Testosteron vor einer inflammatorischen Stimulation mit LPS sollte analysiert werden, ob Testosteron einen antiinflammatorischen Einfluss auf die Immunantwort von TM ausüben konnte.

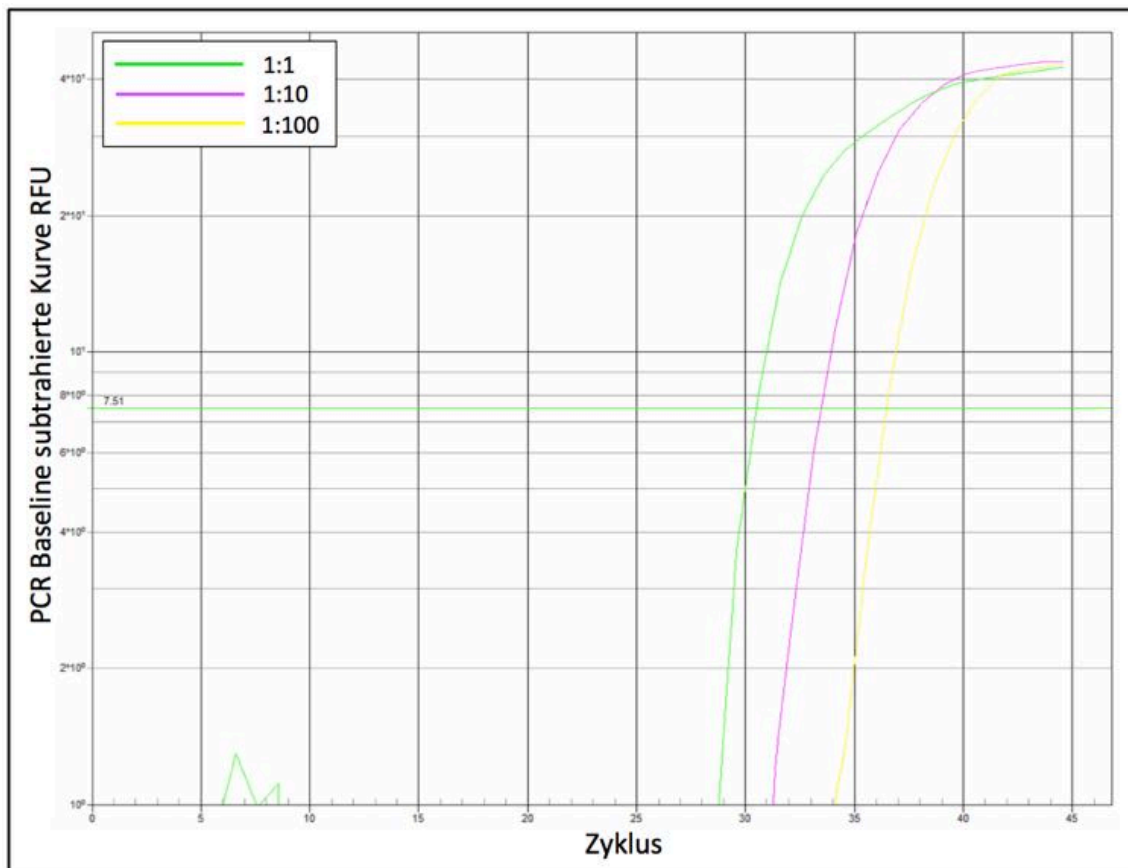
Zu diesem Zweck wurden isolierte TM mit Vehikel (98% Ethanol), LPS (5  $\mu$ g/ml), Testosteron (10, 100, 1000 nM) alleine sowie mit Testosteron und LPS zusammen behandelt. Der genaue Versuchsaufbau ist unter 4.3. in den Methoden dargestellt (Abbildung 6). Im Anschluss wurde die mRNA-Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und der inflammatorischen Marker MCP-1, IL-6 und IL10 mittels qRT-PCR untersucht.

### 5.5.1. Effizienzbestimmung der eingesetzten Primer für qRT-PCR

Die Bestimmung der Effizienz zur Validierung der Genauigkeit des Pipettierens und der Reliabilität der eingesetzten Real Time QuantiTect Primer Assays wurde mittels Verdünnungsreihen (1:1, 1:10, 1:100) durchgeführt. Hier wurden die Qiagen Primer Assays für CD80, CD86 und IL-6 untersucht. Die Effizienz aller weiteren verwendeten

Primer wurde bereits in vorigen Arbeiten der AG Meinhardt verifiziert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Effizienzbestimmung für CD80 dargestellt, welche repräsentativ für die Effizienz von CD86 und IL-6 sind.

Die Intensität der Fluoreszenz wurde am Ende eines jeden Zyklus gemessen und die Werte gegen die korrespondierende Zyklusnummer aufgetragen. Hierdurch wird die Amplifikation ersichtlich, die sich in einer langsam ansteigenden Phase, gefolgt durch eine exponentielle, schnelle Anstiegsphase und abschließend durch eine Plateau Phase zeigt. Der Schwellenwert wurde gerade über die langsam ansteigende Phase gesetzt, sodass sie jede Kurve in der exponentiellen Anstiegsphase kreuzt.

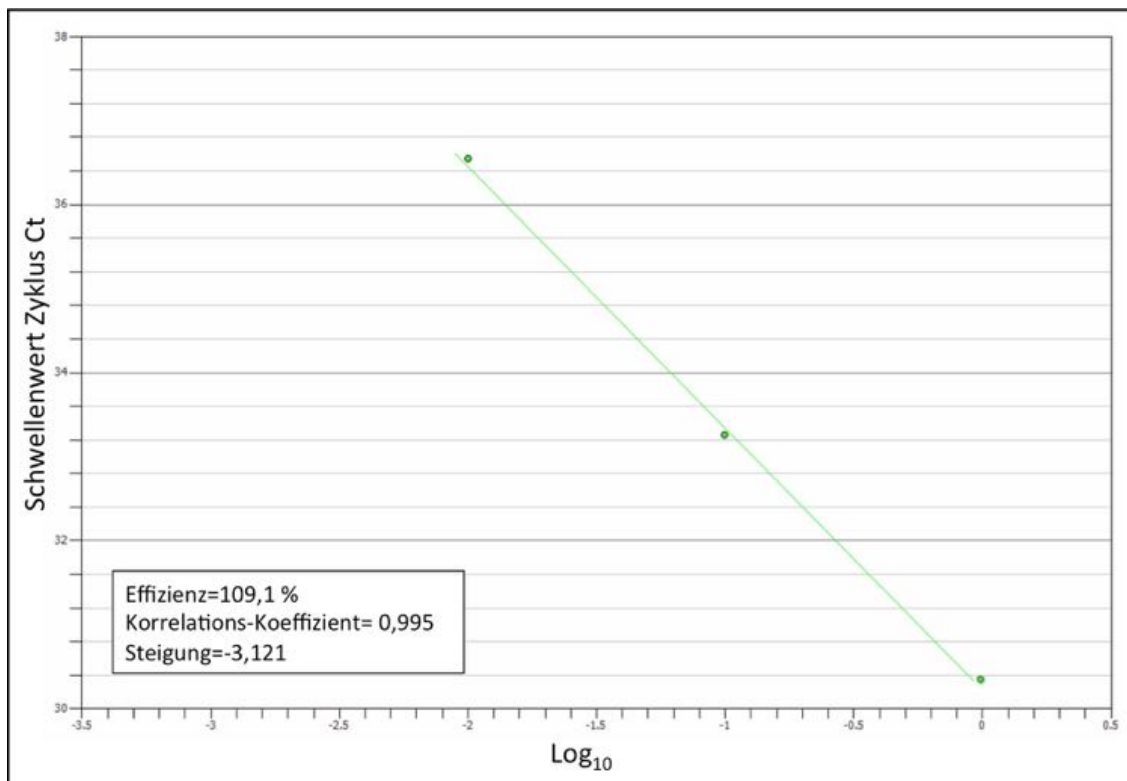


**Abbildung 20: Progression der qRT-PCR Reaktion für CD80 Primer in logarithmischer Darstellung.** Es ist die Verdünnungsreihe von Proben derselben cDNA dargestellt, aufsteigend von links nach rechts mit einem Verdünnungsfaktor von 1:1, 1:10 und 1:100. Der Schwellenwert wird durch die horizontale grüne Linie markiert. Je höher die cDNA Konzentration, desto früher wird der Schwellenwert erreicht und desto geringer ist der Ct-Wert. RFU = Relative Fluorescence Units.

In Abbildung 20 wird die Fluoreszenzkurve in logarithmischer Darstellung gezeigt, d. h. der  $\log_{10}$  (emittierte Fluoreszenz/Zykluszahl). Hier wird der Schwellenwert so niedrig wie möglich gesetzt, ohne dass er mit den Hintergrundsignalen interferiert, sodass die

Ct-Werte optimal bestimmt werden können. Zum Vergleich unterschiedlicher Proben ist es essentiell, dass der Schwellenwert unverändert an derselben Stelle bleibt.

Die Kurven, welche eine höhere Ausgangskonzentration repräsentieren, kreuzen den Schwellenwert eher, sodass hierfür kleinere Ct-Werte entstehen. Der Vergleich der einzelnen Ct-Werte zeigt eine proportionale Korrelation zwischen der für die Reaktion genutzten cDNA Menge und der Größe des PCR Produktes.



**Abbildung 21: Standardkurve der Verdünnungsreihe für CD80.** Die Zyklus Anzahl als Ct-Wert bei Erreichen des Schwellenwertes ist gegen den  $\log_{10}$ (cDNA Verdünnungsfaktor) aufgetragen. Die drei Punkte sind in einer linearen Beziehung. Die berechnete PCR Effizienz beträgt 109,1%.

Die Standardkurve wird generiert indem die Ct-Werte der einzelnen verdünnten Proben gegen den Logarithmus der Startmenge aufgetragen werden und im Anschluss eine Ausgleichsgerade durch diese gelegt wird. Anhand der Ausgleichsgerade können so die Effizienz und der Korrelationskoeffizient bestimmt werden.

Die Berechnung der Effizienz (E) erfolgt anhand der Steigung m der Standardkurve. (Scheffe et al. 2006).

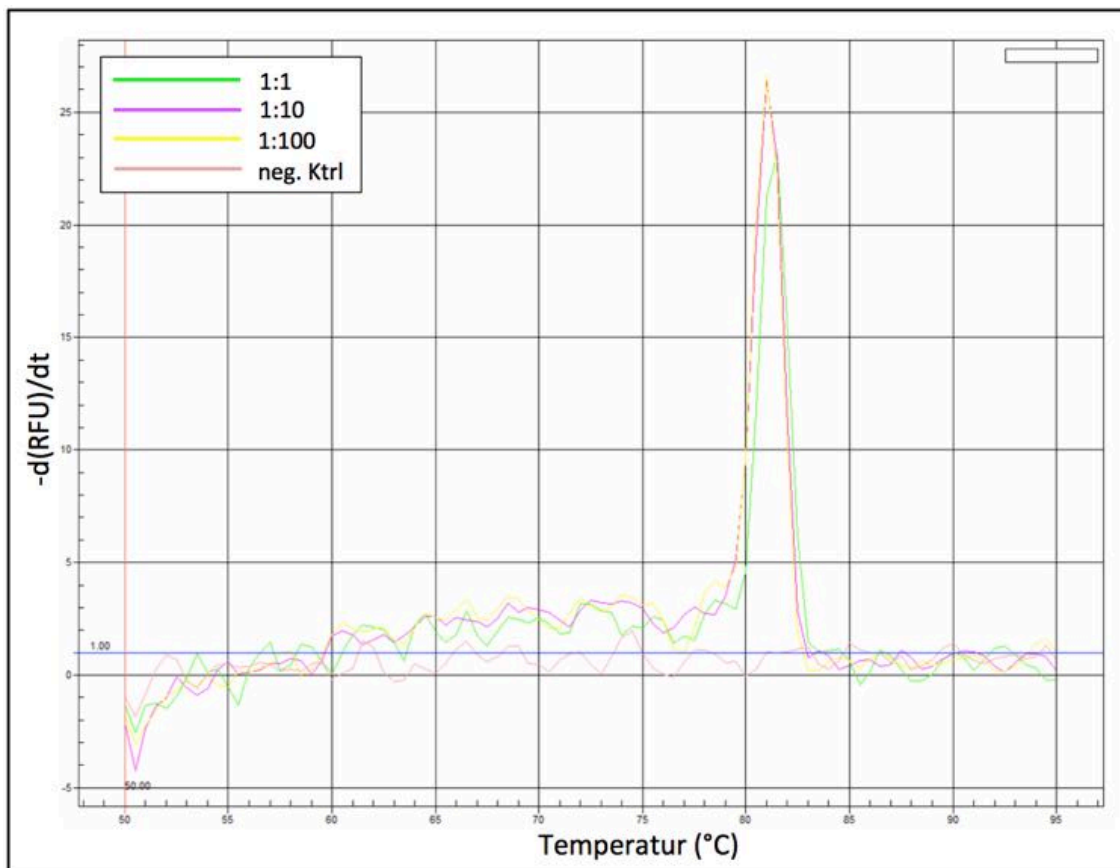
$$E = 10^{-1/m} - 1$$



Bei einer Steigung von  $m = 3,121$  berechnet sich folglich eine Effizienz von 109,1% mit einem Korrelations-Koeffizienten von 0,995. Der Korrelations-Koeffizient sollte so nahe wie möglich an 1 und die PCR Effizienz so nahe wie möglich an 100% sein (Abbildung 21) (Bustin 2000).

In der im Anschluss an die qRT-PCR erstellten Schmelzkurve ist ausschließlich ein Peak (Gipfel) für das untersuchte PCR-Produkt zu sehen. Hierbei wird das Fluoreszenzsignal bei ansteigenden Temperaturen (T) von 50°C bis 100°C gemessen. Durch das Auftragen des Quotienten  $-d(RFU)/dT$ , wobei RFU = Relative Fluorescence Units (relative Fluoreszenz Einheiten), gegen die Temperatur (T) wird der Schmelzkurvengraph erstellt. Die Negativkontrolle zeigt erwartungsgemäß keinerlei Peaks (Abbildung 22).

Die Schmelzkurve liefert Informationen über die Spezifität der Primer. Ist nur ein einzelner Peak zu sehen, zeigt dies, dass in der PCR Reaktion nur eine einzelne cDNA Sequenz amplifiziert wurde. Durch das Übereinanderlegen der Schmelzkurven der einzelnen Proben ist somit nicht nur ersichtlich, ob ein oder mehrere cDNA Sequenzen amplifiziert wurden, sondern auch, ob dasselbe PCR Produkt amplifiziert wurde.



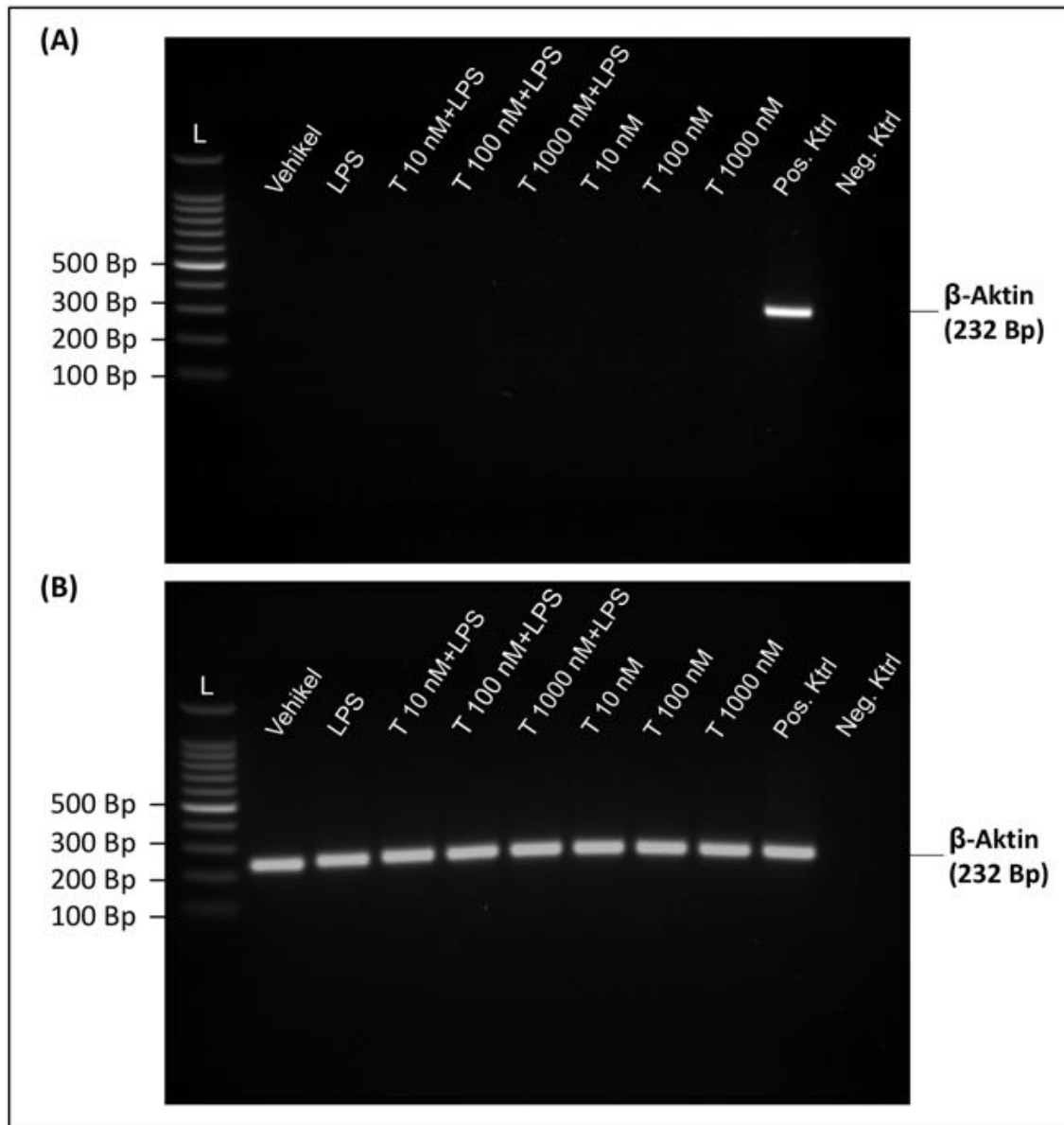
**Abbildung 22: Schmelzkurve der amplifizierten CD80 PCR Produkte.** Die drei Graphen weisen einen übereinstimmenden Peak auf. Die Reaktion verlief folglich spezifisch und in allen

Proben wurde das gleiche Produkt amplifiziert. Die Negativkontrolle weist keinen Peak und folglich kein Amplifikat auf. RFU = Relative Fluorescence Units.

Die QuantiTect Primer Assays für CD80, CD86 und IL-6 erwiesen sich nach der Effizienzberechnung mittels Verdünnungsreihen allesamt als valide und wurden somit in weiteren Experimenten eingesetzt. Die Primer für IL-10 und MCP-1 wurden in unserem Labor bereits mehrfach verwendet und durch vorige Arbeiten der AG Meinhardt validiert (Fijak et al. 2011).

#### **5.5.2. Die Vorbehandlung mit Testosteron hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von CD80, CD86, MCP-1, IL-6 und IL-10 nach Stimulation mit LPS in testikulären Makrophagen**

Nachdem die gesamte RNA aus den behandelten TM anhand von  $\beta$ -Aktin-PCR keine genomische DNA-Verunreinigung aufwies (Abbildung 23 A), wurde die Reverse Transkription durchgeführt. Im Anschluss erfolgte erneut eine  $\beta$ -Aktin-PCR, zwecks Verifizierung der cDNA-Synthese (Abbildung 23 B).

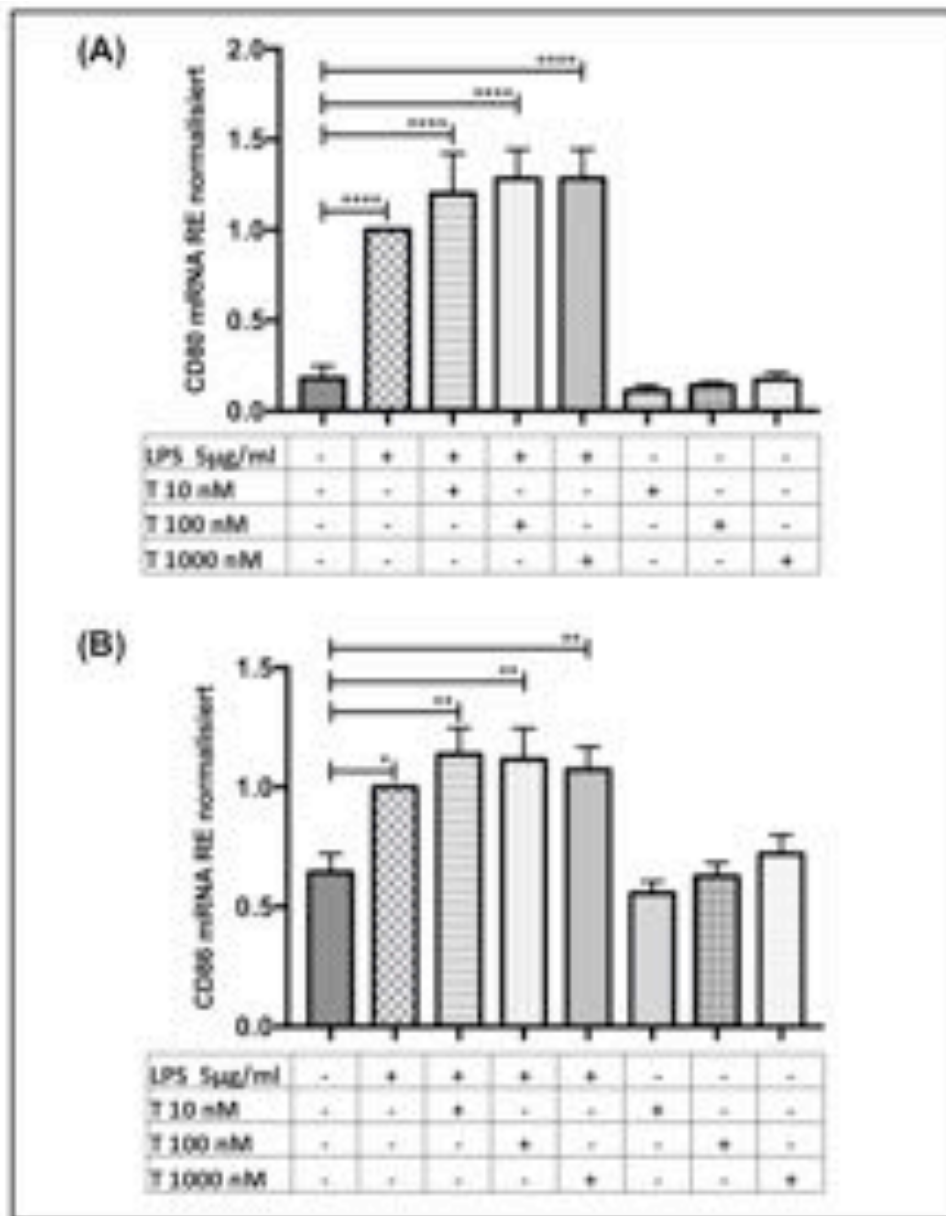


**Abbildung 23: PCR-Untersuchung der RNA aus behandelten testikulären Makrophagen auf genomische DNA-Verunreinigung und Verifizierung der erfolgreichen Reversen Transkription.** Die RNA aus behandelten TM wurde auf das Vorhandensein des Transkripts von  $\beta$ -Aktin (232 Bp) untersucht. A) Die isolierte RNA der behandelten TM weist keinerlei Verunreinigung mit DNA auf. (B) Alle 8 Proben wurden erfolgreich in cDNA umgeschrieben und weisen eine ähnliche Intensität auf. L = cDNA Leiter, Pos. Ktrl = Positivkontrolle mit Hoden cDNA, Neg. Ktrl = Negativkontrolle.

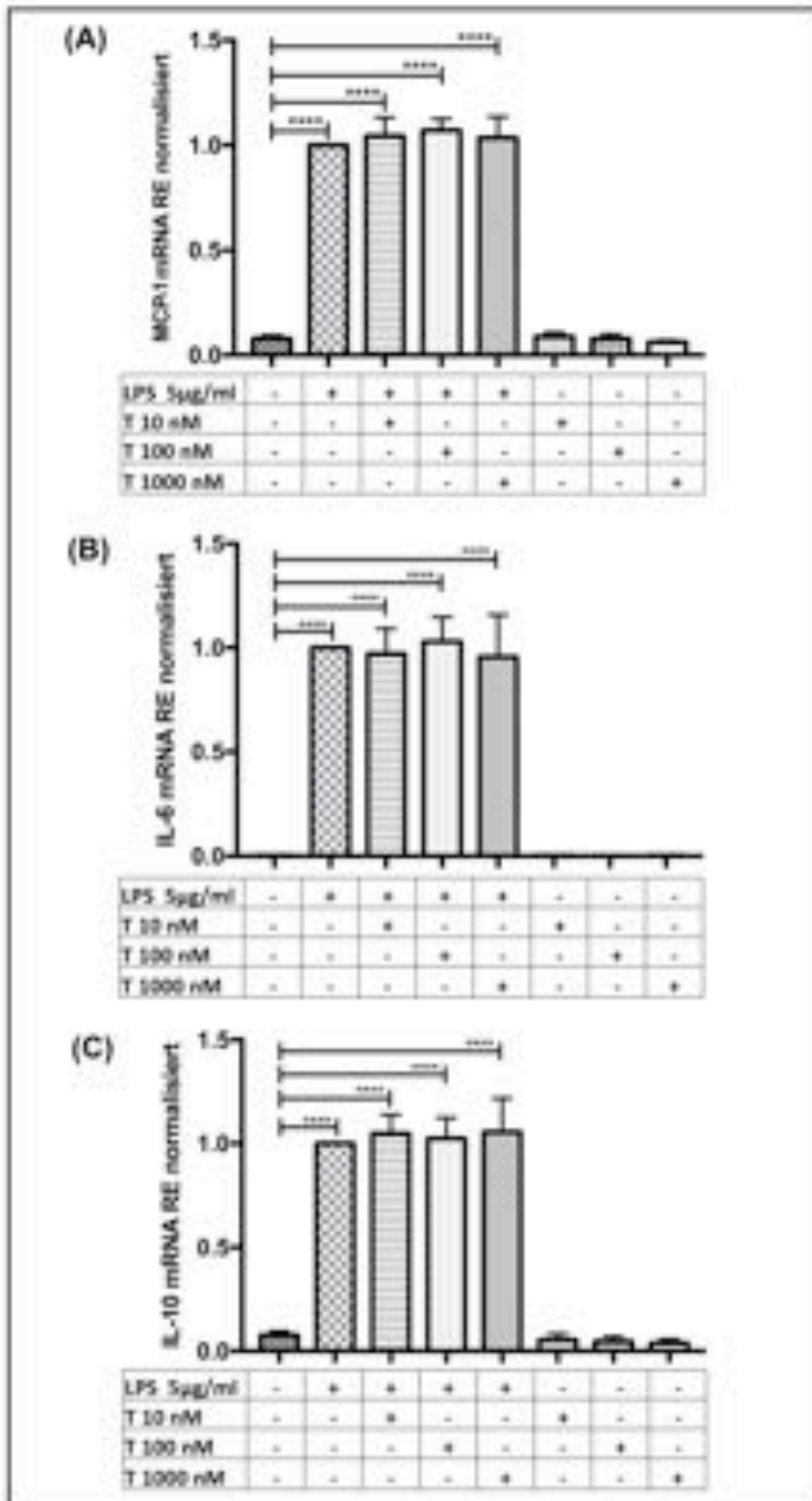
Folgend wurde der Einfluss der Vorbehandlung mit Testosteron auf die mRNA-Expression von MCP-1, IL-6, IL-10, CD80 und CD86 nach LPS-induzierter Inflammation mittels qRT-PCR erforscht.

Die mRNA-Expression aller untersuchten Gene wurde gegenüber der Expression des Housekeeping-Gens  $\beta$ 2-Mikroglobulin mittels der Ct-Werte, wie bereits unter 4.11.1 erklärt, normalisiert.

Die Stimulation mit LPS alleine führte in isolierten TM zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von MCP-1, IL-6, IL-10, CD80 und CD86 (Abbildungen 24 und 25). Eine Vorbehandlung mit Testosteron führte zu keiner Beeinflussung dieses Effekts (Abbildungen 24 und 25). Die Behandlung mit verschiedenen Testosteronkonzentrationen alleine bewirkte ebenfalls keinerlei Veränderung der mRNA-Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie des Chemokins MCP-1 und der untersuchten Zytokine IL-6 und IL-10 (Abbildung 24 und 25).



**Abbildung 24: Eine Vorbehandlung mit Testosteron hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von CD80 und CD86 in testikulären Makrophagen nach LPS-Stimulation.** Die relative Expression (RE) der mRNA von CD80 (A) und CD86 (B) in TM nach 3-stündiger Stimulation mit LPS (5 µg/ml) und 1-stündiger Vorbehandlung mit Testosteron in den angegebenen Konzentrationen wurde mittels qRT-PCR untersucht. Die relative Expression wurde gegenüber der LPS Behandlung normalisiert, welche auf 1,0 gesetzt wurde. Die CD80 und CD86 mRNA-Expression wird nach Stimulation mit LPS signifikant hochreguliert. Die Vorbehandlung mit Testosteron beeinflusst den Anstieg von CD80 und CD86 nach Stimulation mit LPS nicht. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM von vier bis sechs unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . RE = relative Expression, T = Testosteron.



**Abbildung 25:** Die Vorbehandlung mit Testosteron hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von MCP-1, IL-6 und IL-10 in testikulären Makrophagen nach LPS-Stimulation. Die relative Expression (RE) der mRNA von MCP-1 (A), IL-6 (B) und IL-10 (C)

in TM nach 3-stündiger Stimulation mit LPS (5 µg/ml) mit 1-stündiger Vorbehandlung mit Testosteron in den angegebenen Konzentrationen wurde mittels qRT-PCR untersucht. Die relative Expression wurde gegenüber der LPS Behandlung normalisiert, welche auf 1,0 gesetzt wurde. Die mRNA-Expression von allen drei untersuchten inflammatorischen Markern wird nach Stimulation mit LPS signifikant hochreguliert. Die Vorbehandlung mit Testosteron führt zu keiner Verminderung des LPS-abhängigen Anstiegs. Die Daten zeigen den Mittelwert ± SEM von vier bis sechs unabhängigen Experimenten. \*\*\*\*p<0,0001. RE = relative Expression, T = Testosteron.

## 6. Diskussion

TM spielen eine entscheidende Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung des testikulären Immunprivilegs. Residente ED1<sup>-</sup>/ED2<sup>+</sup> TM synthetisieren dauerhaft unter physiologischen Bedingungen antiinflammatorische Zytokine und besitzen eine verminderte Fähigkeit zur Induktion entzündlicher Prozesse im Vergleich zu Makrophagen anderer Gewebe (Kern et al. 1995; Bhushan et al. 2015).

Eine immunsupprimierende Rolle des Testosterons konnte bereits in multiplen Zusammenhängen aufgezeigt werden, wie z. B. beim verminderten Auftreten von Autoimmunerkrankungen bei Frauen oder der Verminderung proinflammatorischer Prozesse nach Testosteronsubstitution (Bebo et al. 1999; Gold & Voskuhl 2009; Haider et al. 2010; Fijak et al. 2011; Nussinovitch & Shoenfeld 2012). Insgesamt scheint Testosteron seinen entzündungshemmenden Effekt über die Inhibition der Synthese proinflammatorischer und die Stimulation der Produktion antiinflammatorischer Zytokine auszuüben (Gornstein et al. 1999; Liva & Voskuhl 2001; Corcoran et al. 2011). Untersuchungen im EAO-Modell zeigen, dass eine Testosteronsubstitution im Verlauf der Erkrankung zu einer Inhibierung der Immunantwort führt (Fijak et al. 2011). Während der EAO kommt es zu einer Reduktion des Serumtestosterons und einer verstärkten Infiltration des Interstitiums mit TM, welche durch Supplementation mit Testosteron genau wie der Gewebeschaden deutlich reduziert wird (Rival et al. 2008; Fijak et al. 2011).

In Anbetracht dessen basiert diese Arbeit auf der Fragestellung, ob Testosteron einen entscheidenden Einfluss auf den immunsuppressiven, antiinflammatorischen Charakter von TM hat und somit zur Erhaltung des testikulären Immunprivilegs beiträgt. Hierzu wurden die drei etablierten Testosteron Signalwege in TM und im Anschluss der Einfluss von Testosteron auf die Produktion kostimulatorischer Moleküle nach Induktion einer akuten Entzündung mit LPS untersucht.

### 6.1. Der AR in testikulären Makrophagen

Während das Vorkommen des AR in SC und PTC in dieser Arbeit aufgezeigt wurde, konnte dieser in TM weder auf Protein noch auf mRNA Ebene nachgewiesen werden.



Prinzipiell diffundiert Testosteron als lipophile Substanz durch die Zellmembran und bindet an den intrazytoplasmatischen AR. Durch diese Bindung kommt es zur Konformationsänderung des AR und es werden entweder der klassische Signalweg oder der nicht-klassische Kinasen-Signalweg aktiviert (Smith & Walker 2014). Der AR wurde bereits 1984 in SC nachgewiesen, was durch viele Folgearbeiten bestätigt wurde (Nakhla et al. 1984; Buzek & Sanborn 1988; Verhoeven & Cailleau 1988a; Anthony Kovacs, W.J. & Skinner 1989; Sar et al. 1990; Vornberger et al. 1994). Auch in PTC gilt der AR-Nachweis als gesichert (Verhoeven & Cailleau 1988b; Buzek & Sanborn 1988; Anthony Kovacs, W.J. & Skinner 1989; Zhou et al. 2002). Darüber hinaus wurde der AR ebenfalls in LC detektiert (Anthony Kovacs, W.J. & Skinner 1989; Sar et al. 1990; Vornberger et al. 1994; Zhou et al. 2002).

Im Gegensatz zu Makrophagen in anderen Geweben, wurde bisher die Präsenz des AR in TM noch nicht dokumentiert. In  $\text{Mac-1}^+$  Makrophagen der Milz von Mäusen wurde das Vorkommen des AR auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Bebo et al. 1999), während dies für peritonealen Makrophagen mittels IF gelang (Ashcroft & Mills 2002; Gilliver et al. 2006; Lai et al. 2009). Die Arbeitsgruppe von Vornberger et al. untersuchte die verschiedenen Zellen des männlichen Hodens auf das Vorkommen des AR, konnte jedoch nicht sicher feststellen, ob TM den AR exprimierten oder nicht (Vornberger et al. 1994). Eine weitere Studie zeigte, dass eine bestimmte interstitielle Zellpopulation des Hodens, bei der es sich höchstwahrscheinlich um TM handelte, keine Färbung des AR zeigte (O'Hara & Smith 2012). Diese Erkenntnisse werden nun von den Daten unterstützt, die in der vorliegenden Arbeit gewonnen wurden und ein Vorhandensein des AR in TM sowohl im Hoden als auch in isolierten primären TM ausschließen. Im Gegensatz dazu wurde bereits 1991 demonstriert, dass  $\text{ED2}^+$  Makrophagen der Prostata zeitweise positiv anfärbbar für den AR waren (Prins et al. 1991).

Residente  $\text{ED1}^+/\text{ED2}^+$  TM entstehen aus Monozyten. Diese wandern aus der Blutbahn ein und entwickeln sich unter dem Einfluss verschiedener Mediatoren wie IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$  und Glukokortikoiden von proinflammatorischen  $\text{ED1}^+/\text{ED2}^-$  Makrophagen (M1-Makrophagen) zu den antiinflammatorischen  $\text{ED1}^+/\text{ED2}^+$  residenten TM (M2-Makrophagen) (siehe Einleitung 2.4.1) (Mosser & Edwards 2008; Martinez et al. 2009). Im Rahmen von Entzündungsprozessen, wie der EAO, kommt es zur vermehrten Rekrutierung von  $\text{ED1}^+/\text{ED2}^-$  aus der Blutbahn (Rival et al. 2006).

In den in dieser Arbeit durchgeführten IF-Färbungen konnte kein Unterschied bezüglich der fehlenden AR-Expression zwischen frisch eingewanderten  $\text{ED1}^+/\text{ED2}^-$  und

residenten ED1<sup>+</sup>/ED2<sup>+</sup> TM festgestellt werden. Ebenso konnte keinerlei Unterschied bezüglich der Darstellbarkeit des AR zwischen normalem und EAO Hoden beobachtet werden. Darüber hinaus konnte der AR in TM weder mittels Immunoblotverfahren noch PCR Untersuchung nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass isolierte Makrophagen aus der Milz von Ratten positiv für die mRNA-Expression des AR waren und dass steigende Konzentrationen an Testosteron zu verminderten mRNA Levels des AR führten (Figuroa et al. 2012). Die intratestikuläre Konzentration an Testosteron (340 bis 20000 nM) ist 25 bis 125 Mal so hoch wie im Serum (8,7-35 nM) (Walker 2011). Möglicherweise könnte eben diese Nähe von TM zu den Androgen-produzierenden LC, und die daraus resultierende hohe Konzentration an Testosteron, in direktem Zusammenhang mit dem Verlust, bzw. der nicht vorhandenen Expression des AR in TM stehen. Demgegenüber steht jedoch die Feststellung, dass die Expression des AR in von Monozyten aus peripherem Blut abstammenden Makrophagen von Männern höher als bei selbigen von Frauen ist (McCrohon et al. 2000). Im darauffolgenden Schritt wurde der nicht-klassische Kinasen-Signalweg in TM erforscht.

## **6.2. Der nicht-klassische Kinasen-Signalweg in testikulären Makrophagen**

Es wurden bis dato zwei Signalwege beschrieben, die durch den AR vermittelt ablaufen: der klassische Testosteron Signalweg und der nicht-klassische Kinasen Signalweg. In dem klassischen Signalweg bindet durch die Plasmamembran diffundiertes, freies Testosteron den AR, welcher daraufhin in den Nukleus transloziert und durch die Bindung an ARE spezifische Genexpressionen beeinflusst (Burgos-Trinidad et al. 1997; Shang et al. 2002). In dem nicht-klassischen Kinasen-Signalweg führt die Bindung von Testosteron an den AR über die Aktivierung einer Src Tyrosin Kinase zur Initiierung einer MAP-Kinasen-Kaskade, welche die CREB vermittelte Genexpression induziert (Fix et al. 2004). Anders als beim klassischen-Testosteron Signalweg, der nach Stimulation mindestens 30 bis 45 Minuten zur Änderung der Protein Level in der Zelle benötigt, kommt es beim nicht-klassischen Signalweg innerhalb weniger Minuten zur Phosphorylierung von ERK 1/2 und CREB und folglich zur Alteration von Zellfunktionen (Cheng et al. 2007; Smith & Walker 2014).

Der nicht-klassische Kinasen-Signalweg wurde in dieser Arbeit in SC durch Testosteron induziert, konnte jedoch für TM nicht gefunden werden.

In SC konnte der nicht-klassische Kinasen-Signalweg bereits nachgewiesen werden (Fix et al. 2004). Die in dieser Arbeit gezeigte Phosphorylierung von ERK 1/2 und CREB zur Untersuchung des nicht-klassischen Kinasen-Signalweges in SC ist in Übereinstimmung mit den bisher veröffentlichten Ergebnissen (Fix et al. 2004). Die Aktivierung der Src und ERK Kinase in SC trägt zur Aufrechterhaltung von SC-Keimzellverbindungen bei und reguliert die Freisetzung reifer Spermien von SC ins Lumen der Tubuli (Chapin et al. 2001; Zhang et al. 2005; Shupe et al. 2011).

Der nicht-klassische Kinasen-Signalweg konnte ebenfalls in Mausmonozyten nachgewiesen werden. Hier führte die Stimulation mit 5- $\alpha$ -DHT zur Phosphorylierung von ERK 1/2 (Pergola et al. 2011). In Makrophagen wurde der nicht-klassische Kinasen-Signalweg bis dato nicht detektiert. Die Stimulation mit 10 nM Testosteron führte in der RAW 264.7 Mausmakrophagen-Zelllinie, welche keinen intrazellulären AR aufweisen, nicht zu der Aktivierung des MAP-Kinasen-Signalweges (Guo et al. 2002; Benten et al. 2004). Auch die Induktion der c-fos Promotor Aktivität, einem Transkriptionsfaktor der Activator Protein-1 (AP-1) Familie, der als Marker für frühe genotrope Signalisierungen dient, konnte nach Stimulation mit Testosteron nicht festgestellt werden (Guo et al. 2002). Auch in den Mausmakrophagen aus Knochenmark, in denen der AR nicht nachweisbar war, konnte keine Phosphorylierung von ERK 1/2 nach Stimulation mit 10 nM Testosteron nach 15, 60 und 120 Min. festgestellt werden (Liu et al. 2006). Folglich kann der Testosteron-abhängige MAP-Kinasen-Signalweg nur in Zellen induziert werden, die auch den AR aufweisen (Fix et al. 2004). So konnte in transgenen Mäusen, mit einem SC spezifischem AR knock-out, in denen Exon 3 des AR entfernt worden war, weder der klassische noch der nicht-klassische Kinasen-Signalweg nach Stimulation mit Testosteron nachgewiesen werden (Lim et al. 2009; Walker 2011). Umgekehrt kann demnach gefolgert werden, dass Zellen, in denen der Testosteron-abhängige MAP-Kinasen-Signalweg nicht nachweisbar ist, potentiell keinen AR aufweisen. Die fehlende Induzierbarkeit des nicht-klassischen Signalweges in TM bestätigte somit vorherige Befunde dieser Arbeit, dass TM den AR nicht exprimieren.

### 6.3. Der nicht-klassische $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg in testikulären Makrophagen

Im folgenden Schritt wurde die Aktivierung von TM durch Testosteron über den nicht-klassischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg erforscht. Dabei zeigten TM keine Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Stimulation mit Testosteron.

Neben dem klassischen Testosteron-Signalweg und dem nicht-klassischen Kinasen-Signalweg ist ein dritter, der sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg, beschrieben worden. Er ist vom AR unabhängig und wird über einen membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptor induziert (Shihan et al. 2014). Etwa 30-45 Sek. nach Stimulation mit Testosteron kommt es zu einem intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  Anstieg durch das Öffnen spannungsabhängiger L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle (Lyng et al. 2000).

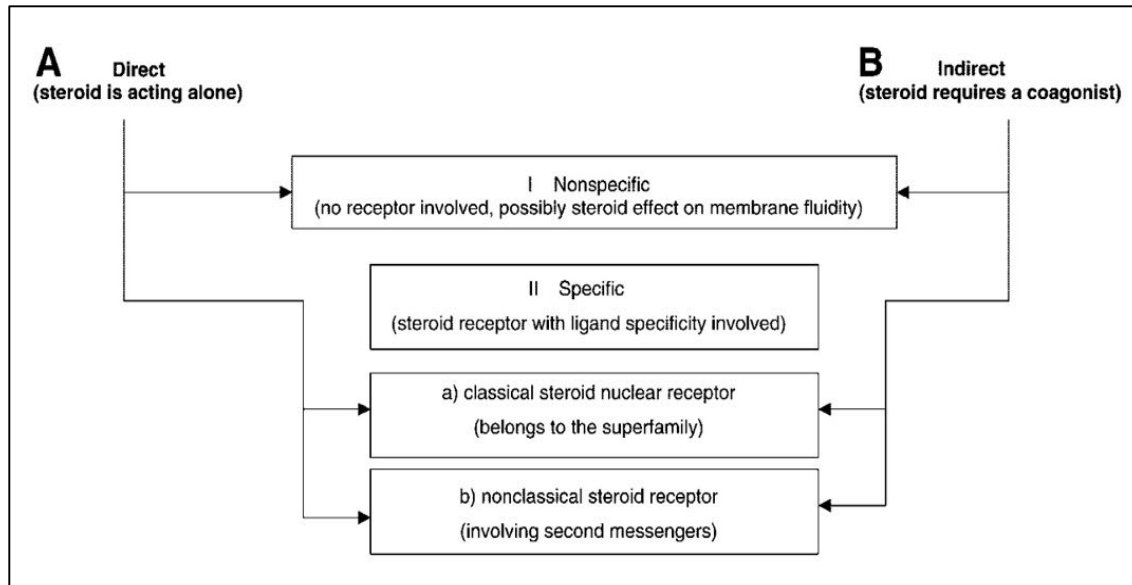
Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg wurde im männlichen Hoden als erstes in SC nachgewiesen (Gorczyńska & Handelsman 1995; Leite et al. 1999; Von Ledeber et al. 2002). In einer Studie von Benten et al. aus dem Jahre 1999 wurde gezeigt, dass peritoneale Makrophagen IC-21 von der Maus, welche den AR nicht aufweisen, auf die Stimulation mit 10 nM Testosteron durch die rapide Freisetzung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  antworteten (Benten et al. 1999). Auch in der AR-freien RAW 264.7 Mausmakrophagen-Zelllinie konnte der nicht-klassische  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg nach Stimulation mit 10 nM Testosteron nachgewiesen werden (Guo et al. 2002). In diesem Kontext sind jedoch zwei entscheidende Unterschiede zu den in dieser Arbeit untersuchten Zellen hervorzuheben: Erstens handelte es sich bei den von Benten und Guo untersuchten Zellen um Makrophagen-Zelllinien und zweitens stammen diese aus Mäusen und nicht, wie die Zellen der vorliegenden Studie, aus Ratten. Nichtsdestotrotz bestand die Annahme, dass TM ebenfalls auf die Stimulation mit Testosteron durch die Induktion des nicht-klassischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweges antworten würden. Die Untersuchungen dieser Arbeit demonstrieren, dass es zu keiner Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Applikation von 10, 100 oder 1000 nM Testosteron in TM der Ratte kam. Die Vitalität und Responsivität der Zellen wurde durch einen rapiden  $\text{Ca}^{2+}$  Anstieg nach Stimulation mit ATP gezeigt. Ergo konnte die Aktivität des nicht-klassischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweges in TM ausgeschlossen werden. Ein großer Vorteil der Messung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen mittels der Fura-2AM Methode ist die Bestimmung in vorher definierten Einzelzellen. TM sind unter

dem Mikroskop morphologisch gut anhand der Größe und Beschaffenheit des Zellplasmas von möglichen Kontaminanten (z. B. LC und Keimzellen) zu unterscheiden. Folglich konnte bei der Messung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx sichergestellt werden, dass ausschließlich TM und keinerlei kontaminierenden Zellen in die Messung eingeschlossen wurden.

#### **6.4. Testosteron hat keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Expression proinflammatorischer Moleküle in testikulären Makrophagen**

Im Folgenden wurde weiter untersucht, ob eine Testosteronvorbehandlung einen immunsuppressiven Einfluss auf die Ausschüttung kostimulatorischer Moleküle nach LPS-induzierter Inflammation in vitro auf TM haben könnte. Es zeigte sich jedoch keinerlei Verminderung der LPS-medierten Hochregulation proinflammatorischer oder kostimulatorischer Moleküle durch eine Vorbehandlung mit Testosteron.

Eine Vielzahl an Studien der letzten Jahre konnte nachweisen, dass intrazelluläre Steroidhormon-Rezeptoren entbehrlich sind, um nicht-genomische Effekte von Steroiden zu vermitteln (Benten et al. 1999; Guo et al. 2002; Wunderlich et al. 2002; Shiha et al. 2014). Im Jahre 2000 veröffentlichten Falkenstein, Norman und Wehling die Mannheim Klassifikation nicht-genomischer Steroid Aktionen (Abbildung 26) (Falkenstein et al. 2000). Diese veranschaulicht die verschiedenen Mechanismen über die Steroide Einfluss auf Zellen ausüben können, und hilft den Unterschied zwischen klassischen und nicht-klassischen Signalwegen zu verstehen.

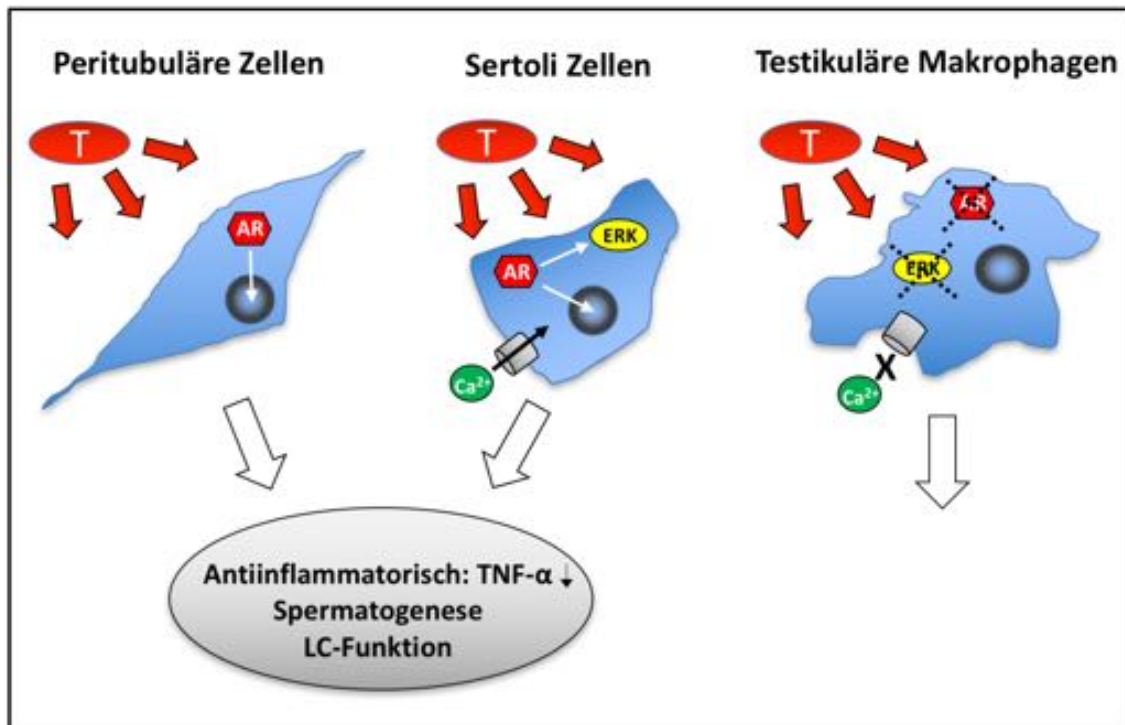


**Abbildung 26: Die Mannheim Klassifikation nicht-genomischer Steroid Aktionen.** Mit der Mannheim Klassifikation wird versucht, mögliche Mechanismen von Steroid Signalübertragungen in ein Schema zu vereinen. Bis dato sind jedoch nicht für alle Klassen Beispiele bekannt. Abdruck nach freundlicher Genehmigung von Oxford University Press: The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism (Falkenstein et al. 2000), Copyright 2000.

Hierzu werden die Signalwege in die Gruppen A und B eingeteilt, die sich durch die Notwendigkeit eines Koagonisten zur Signaltransduktion unterscheiden. Innerhalb dieser Gruppen erfolgt eine weitere Unterteilung in unspezifische und Ligandenspezifische Steroid Aktionen, die wiederum durch den klassischen und nicht-klassischen Steroidrezeptor separiert werden. Nach Kategorie AI können Steroidvermittelte, nicht-genomische Effekte ohne die Involvierung eines Rezeptors stattfinden. Beispielhaft konnte in Spermatozoen, Brustkrebszellen und vaginalen Epithelzellen nachgewiesen werden, dass Steroide in die Phospholipid-Doppelschicht von Membranen eingelagert werden und dadurch die Membranfluidität beeinflussen konnten (Reddy et al. 1989; Clarke et al. 1990; Shivaji & Jagannadham 1992). Interessanterweise konnte bis dato nicht für alle Kategorien der Mannheim Klassifikation ein Beispiel gefunden werden. Obwohl es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war, eine Wirkung von Testosteron auf TM nachzuweisen, darf hieraus, in Anbetracht der verschiedenen Steroidsignalwege, nicht der vorschnelle Schluss gezogen werden, dass keinerlei Beeinflussung von TM durch Testosteron stattfindet. Vielmehr wurde nachgewiesen, dass LC einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung und Rekrutierung von TM in der Embryogenese ausüben (Raburn et al. 1993). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die gezielte Zerstörung von LC mit Ethan-Dimethan-Sulfonat (EDS) zu einer Abnahme der TM Anzahl führte (Wang et al.

1994). Gleichmaßen wurde demonstriert, dass die Implantation von hochdosiertem Testosteron, welches die LC Funktion inhibiert, zu einer 40%igen Abnahme der Anzahl residenter TM führte (Meinhardt et al. 1998). Daraus leitete sich die Arbeitshypothese ab, dass Testosteron über einen bis dato unbeschriebenen Signalweg seine Wirkung auf TM ausübe.

In vorigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die LPS induzierte TNF- $\alpha$  mRNA-Expression in SC und PTC durch die Vorbehandlung mit 1000 nM Testosteron unterdrückt werden konnte (Fijak et al. 2015). Andere Studien haben auch demonstriert, dass Androgene *in vitro* inflammatorische Prozesse eindämmen können (Agostino et al. 1999; Bebo et al. 1999; Gornstein et al. 1999; Cutolo et al. 2004; Corcoran et al. 2011; Kissick et al. 2014). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Expression vom Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) in der RAW 264.7 Makrophagen-Zelllinie durch eine Behandlung mit Testosteron vermindert wurde (Rettew et al. 2008). TM weisen im Vergleich zu peritonealen Makrophagen insgesamt eine geringere Expression konstitutiver Gene des TLR Signalweges auf (Bhushan et al. 2015). Des Weiteren reduzierte das Androgen-Derivat 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -Diol die Expression proinflammatorischer Gene nach Stimulation mit LPS und TNF- $\alpha$  in Makrophagen aus der U937 Monozyten-Zelllinie (Norata et al. 2010). Im Gegensatz zu den genannten Befunden konnte in der vorliegenden Studie kein suppressiver Einfluss von Testosteron auf die LPS-induzierte Ausschüttung von MCP-1, IL-6, IL-10, CD80 und CD86 in TM dokumentiert werden.



**Abbildung 27: Testosteron-Signalwege in Peritubulären Zellen, Sertoli Zellen und testikulären Makrophagen.** Der AR wird sowohl in PTC als auch in SC exprimiert (Vornberger et al. 1994). Der nicht-klassische Kinasen- und der Ca<sup>2+</sup>-Influx-Signalweg wurden in SC nachgewiesen (Gorczyńska & Handelsman 1995; Fix et al. 2004). Durch eine Vorbehandlung mit 1000 nM Testosteron konnte die LPS induzierte TNF-α mRNA-Expression in SC und PTC unterdrückt werden (Fijak et al. 2015). Darüber hinaus scheint Testosteron in PTC und SC, einen Einfluss auf die physiologische Entwicklung und Differenzierung von LC zu haben (Welsh et al. 2012). Die Ausschaltung des AR in PTC und SC mittels experimentellem knock-out (ARKO=spezifischer AR knock-out) in Mäusen führte zu Infertilität und Azoospermie (Chang et al. 2004; De Gendt et al. 2004). TM exprimieren den AR nicht. In dieser Arbeit konnte außerdem kein Einfluss von Testosteron auf isolierte TM der Ratte über die bekannten Signalwege nachgewiesen werden. AR = Androgen Rezeptor, ERK = Extracellular Signal-Regulated Kinase, LC = Leydig Zelle, T = Testosteron, TNF-α = Tumornekrosefaktor-α.

Zusammenfassend wurde herausgefunden, dass TM keinen AR exprimieren. Es konnte weder der klassische, noch der Kinasen- oder Ca<sup>2+</sup>-Influx-Signalweg in TM nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte die Vorbehandlung mit Testosteron keinen Einfluss auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von kostimulatorischen Molekülen. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass TM entgegen der ursprünglichen Arbeitshypothese nicht direkt von Testosteron beeinflusst werden können. Gleichwohl besteht eine örtlich enge Beziehung zwischen LC und TM, welche eine kontinuierliche gegenseitige Beeinflussung erleichtert und TM somit hohen lokalen Testosteron Spiegeln exponiert sind. Als Beleg für die gegenseitige Beeinflussung von TM und LC dient, dass eine experimentelle Depletion von TM zur Abnahme der Steroidogenese führte (Huhtaniemi et al. 1986; Bergh et al. 1993). Dies leitete zu der Entdeckung, dass



25-Hydroxycholesterol von TM produziert und sezerniert wird, welches eine direkte Stimulation der LC Steroidogenese bewirkt (Nes et al. 2000; Lukyanenko et al. 2001). Durch die direkte Beeinflussung der Steroidogenese mittels TM-sezerniertem 25-Hydroxycholesterol geschieht, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass umgekehrt Steroidhormonderivate eine Wirkung auf TM ausüben. Diese Hypothese wird dadurch akzentuiert, dass, wie schon von Rival et al. aufgezeigt (Rival et al. 2008) und in dieser Arbeit bestätigt, die numerische Anzahl von TM während der EAO, in welcher die Testosteron Level im Hoden vermindert sind, zunimmt. Auch bei Patienten mit einer Nicht-Obstruktiven-Azoospermie (NOA = Non Obstructive Azoospermia) wurde ein Testosterondefizit und konsekutiv eine erhöhte Anzahl an TM nachgewiesen (Goluza et al. 2014).

Dies leitet zu der Annahme, dass der Einfluss von Testosteron auf TM indirekt, z. B. über Makrophagen-beeinflussende Faktoren stattfindet. Der Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) ist ein von Zellen des Immunsystems produziertes Glykoprotein, das essentiell für die in vitro Differenzierung von Vorläuferzellen des Knochenmarks in reife Granulozyten und Makrophagen ist (Cantrell et al. 1985). Testikuläre Makrophagen besitzen einen Rezeptor für den GM-CSF (Morstyn & Burgess 1988; Vilanova et al. 2003). Frauen besitzen geringere Serum Level an GM-CSF als Männer (Furman et al. 2014). Die physiologische Rolle vom GM-CSF im Hoden bleibt jedoch weitgehend unbekannt. Der GM-CSF scheint eine Rolle bei dem Proliferations- und Differenzierungsprozess der Spermatogenese zu spielen und, darüber hinaus, die Motilität von Spermien zu beeinflussen (Vilanova et al. 2003). In Ratten mit einem anaplastischen Dunning R3327 MAT-LyLu Prostata Tumor bewirkte die Therapie mit rekombinantem GM-CSF eine erhöhte Testosteron-Gewebsretention (Rubenstein et al. 1991). Umgekehrt könnte Testosteron über Makrophagen-beeinflussende Faktoren, wie den GM-CSF, einen Wirkung auf TM ausüben.

Ergo muss weiterhin die elementare Frage gestellt werden, ob und ggf. wie Testosteron die für die Wahrung des Immunprivilegs und der männlichen Fertilität so wichtigen TM beeinflusst. Die Supplementierung von immunsuppressiv wirksamem Testosteron bei autoimmunen Prozessen des Hodens zur Verhinderung exzessiven Gewebeschadens wurde bereits diskutiert (Fijak et al. 2015). Doch um dies als tatsächliche Therapie in

Betracht ziehen zu können, sollte im ersten Schritt die antiinflammatorische Rolle von Testosteron im Hoden besser verstanden werden. Diese Arbeit hat hierzu insofern einen Beitrag geleistet als das TM als direkte Zielzellen der immunsuppressiven Wirkung von Testosteron ausgeschlossen werden können.

---

## 7. Zusammenfassung

---

### 7.1. Zusammenfassung

Der Hoden ist ein immunprivilegiertes Organ, d. h., dass die Neo-Autoantigene meiotischer und haploider Keimzellen vom Immunsystem toleriert werden. Dazu sind aller Voraussicht nach nicht ein, sondern eine Vielzahl an Mechanismen verantwortlich. Paradoxerweise ist der Hoden trotzdem zu Abwehrreaktionen gegen Mikroben sowie zu (auto)-inflammatorischen Prozessen fähig, die jeweils zu temporären oder dauerhaften Beeinträchtigungen der Fertilität führen können. Akkumulierte Daten weisen deutlich auf eine systemische, antiinflammatorische Rolle von Testosteron hin. Auch lokal konnte nachgewiesen werden, dass Testosteron den Lipopolysaccharid(LPS)-induzierten Anstieg der TNF- $\alpha$  Expression in Sertoli (SC) und peritubulären Zellen (PTC) supprimiert.

Durch ihre überwiegend antiinflammatorischen Eigenschaften (M2-Phänotyp) sind testikuläre Makrophagen (TM) wichtige Mediatoren des testikulären Immunprivilegs. Unklar ist, ob Testosteron eine direkte Wirkung auf TM entfalten kann. Basierend auf den vorher beschriebenen immunsuppressiven Effekten von Testosteron auf SC und PTC, war es deshalb das Ziel dieser Arbeit, einen möglichen direkten Einfluss von Testosteron auf TM zu untersuchen.

Für die Wirkungsvermittlung von Testosteron sind drei Signalwege bekannt: (i) der klassische Signalweg über den Androgen Rezeptor (AR) durch die Bindung an Androgen Response Elemente (ARE) im Nukleus, (ii) der nicht-klassische Kinasen-Signalweg durch die AR-vermittelte Phosphorylierung spezifischer Kinasen (ERK, CREB) und (iii) der nicht-klassische  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg durch den AR unabhängigen, intrazellulären Calciumanstieg. In dieser Arbeit wurde mittels Immunfluoreszenz (IF), Immunoblot (IB) und Polymerase Kettenreaktion (PCR) demonstriert, dass TM keinen AR exprimieren. Nach Stimulation mit Testosteron konnte in isolierten TM der Ratte keine Phosphorylierung von ERK 1/2 und CREB nachgewiesen werden. Auch der nicht-klassische  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Signalweg konnte in isolierten TM nach Stimulation mit Testosteron nicht dokumentiert werden. Abschließend wurde der Effekt einer Vorbehandlung mit 10, 100 und 1000 nM Testosteron auf die mRNA Produktion kostimulatorischer Moleküle (CD80, CD86) und inflammatorischer Mediatoren (MCP-1, IL-6 und IL-10) nach Induktion einer akuten

Inflammation mittels LPS untersucht. Diese zeigte allerdings keinen Einfluss auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von CD80, CD86, MCP-1, IL-6 und IL-10 in TM. Zusammenfassend zeigen die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten, dass Testosteron unter den verwendeten experimentellen Bedingungen keinen direkten Einfluss über die bekannten Signalwege auf TM ausübt. Somit kann man TM weitgehend als direkte Zielzellen einer Testosteron-Wirkung ausschließen. Offensichtlich entfaltet Testosteron seine antiinflammatorische Wirkung über direkte Wirkung auf SC und PTC. Ob TM ggf. indirekt über androgen-abhängige antiinflammatorische Mediatoren aus diesen Zellen beeinflusst werden, ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

## 7.2. Summary

The testis is an immune privileged organ, i.e. neo-auto-antigens of meiotic and haploid germ cells are tolerated. Most likely not only one but a multitude of mechanisms is responsible for the establishment and maintenance of testicular immune privilege. Paradoxically the testis is capable of mounting adequate immune responses towards invading pathogens and to elicit (auto)-inflammatory processes, that can lead to temporary or permanent fertility disturbances. Increasing evidence has accumulated that strongly proposes systemic anti-inflammatory properties for testosterone. On the local level it was demonstrated that testosterone was able to suppress the LPS induced increase of the TNF- $\alpha$  mRNA expression in Sertoli (SC) and peritubular cells (PTC).

Due to their primarily anti-inflammatory characteristics testicular macrophages (TM) (M2-phenotype) are considered important regulators of the testicular immune privilege. However, it remains unclear whether testosterone is able to directly influence TM. Based on the previously described immunosuppressive function of testosterone on SC and PTC, the aim of the present work was to investigate a possible influence of testosterone on TM. Currently three signalling pathways of testosterone are known: (i) the classical pathway via the androgen receptor (AR) through the binding to androgen response elements (ARE) in the nucleus, (ii) the non-classical kinase activation pathway through the AR mediated phosphorylation of specific kinases (ERK, CREB) and (iii) the non-classical  $\text{Ca}^{2+}$  influx pathway through the AR independent, intracellular calcium influx. In this work, the absence of the AR in TM was demonstrated at the protein and mRNA level by immunofluorescence, immunoblot and polymerase chain reaction, respectively. In further steps, a possible activation of the molecules of the non-classical kinase activation pathway was analysed. After stimulation of isolated rat TM with testosterone a phosphorylation of ERK 1/2 or CREB was not detected. Moreover, a  $\text{Ca}^{2+}$  influx could not be demonstrated in isolated TM after stimulation with 10, 100 or 1000 nM testosterone. Finally, the effect of a pretreatment with 10, 100 and 1000 nM testosterone on the mRNA expression of costimulatory molecules (CD80, CD86) and inflammatory mediators (MCP-1, IL-6, IL-10) after challenge with LPS to mimic an acute inflammation was investigated. In this regard, testosterone pretreatment showed no influence on the LPS induced mRNA expression of CD80, CD86, MCP-1, IL-6 and IL-10 in TM.

In summary, the presented data in this thesis show that under the tested experimental conditions testosterone does not exert a direct influence on TM via the known signalling pathways.

Hence TM can be excluded as a direct target of testosterone action. Apparently, testosterone exerts its anti-inflammatory effect directly on SC and PTC. If TM are influenced indirectly via androgen-dependent, anti-inflammatory mediators from these cells is part of future research.

## 8. Literaturverzeichnis

- Aafjes, J.H. & van der Vijver, J.C., 1985. Fertility of men with and without a varicocele. *Fertility and Sterility*, 43(6), pp.901–904.
- Agostino, P., Milano, S., Barbera, C., Di Bella, G., La Rosa, M., Ferlazzo, V., Farruggio, R., Miceli, D.M., Miele, M., Castagnetta, L. & Cillari, E., 1999. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 876, pp.426–429.
- Ailenberg, M., Tung, P.S. & Fritz, I.B., 1990. Transforming Growth Factor- $\alpha$  Elicits Contractility of Testicular. *Biology of Reproduction*, 42(3), pp.499–509.
- Akdis, C.A., Joss, A., Akdis, M., Faith, A. & Blaser, K., 2000. A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. *FASEB Journal*, 14(12), pp.1666–1668.
- Albrecht, M., 2009. Insights into the nature of human testicular peritubular cells. *Annals of Anatomy*, 191(6), pp.532–540.
- Anthony Kovacs, W.J., C.T. & Skinner, M.K., 1989. Analysis of the androgen receptor in isolated testicular cell types with a microassay that uses an affinity ligand. *Endocrinology*, 125(5), pp.2628–2635.
- Ariyaratne, H.B. & Chamindrani Mendis-Handagama, S., 2000. Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biology of Reproduction*, 62(3), pp.680–690.
- Ashcroft, G.S. & Mills, S.J., 2002. Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(5), pp.615–624.
- Aubry, F., Habasque, C., Satie, a P., Jégou, B. & Samson, M., 2000. Expression and regulation of the CC-chemokine monocyte chemoattractant protein-1 in rat testicular cells in primary culture. *Biology of Reproduction*, 62(5), pp.1427–35.
- Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J.H., Lanier, L.L. & Somoza, C., 1993. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature*, 366(6), pp.76–79.
- Azuma, M., Yssel, H., Phillips, J.H., Spits, H. & Lanier, L.L., 1993. Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(3), pp.845–50.

- Banchereau, J. & Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(2), pp.245–252.
- Banks, W.A., Kastin, A.J. & Gutierrez, E.G., 1994. Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neuroscience Letters*, 179(1–2), pp.53–56.
- Bastard, J.P., Jardel, C., Delattre, J., Hainque, B., Bruckert, E. & Oberlin, F., 1999. Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects. *Circulation*, 99(16), pp.2221–2222.
- Bebo, B.F., Schuster, J.C., Vandenbark, a a & Offner, H., 1999. Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells. *Journal of Immunology*, 162(1), pp.35–40.
- Behre, H.M., 2013. *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes, Ausgabe 2* Springer-Verlag, ed.,
- Benten, W.P., Lieberherr, M., Stamm, O., Wrehlke, C., Guo, Z. & Wunderlich, F., 1999. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Molecular Biology of the Cell*, 10(10), pp.3113–3123.
- Benten, W.P.M., Guo, Z., Krücken, J. & Wunderlich, F., 2004. Rapid effects of androgens in macrophages. *Steroids*, 69(8), pp.585–590.
- Bergh, A., Damber, J.E. & van Rooijen, N., 1993. Liposome-mediated macrophage depletion: an experimental approach to study the role of testicular macrophages in the rat. *The Journal of Endocrinology*, 136(3), pp.407–413.
- Bhushan, S., Hossain, H., Lu, Y., Geisler, A., Tchatalbachev, S., Mikulski, Z., Schuler, G., Klug, J., Pilatz, A., Wagenlehner, F., Chakraborty, T. & Meinhardt, A., 2011. Uropathogenic E. coli induce different immune response in testicular and peritoneal macrophages: Implications for testicular immune privilege. *PLOS ONE*, 6(12), pp.1–15.
- Bhushan, S., Tchatalbachev, S., Klug, J., Fijak, M., Pineau, C., Chakraborty, T. & Meinhardt, A., 2008. Uropathogenic Escherichia coli block MyD88-dependent and activate MyD88-independent signaling pathways in rat testicular cells. *Journal of Immunology*, 180(8), pp.5537–5547.
- Bhushan, S., Tchatalbachev, S., Lu, Y., Frohlich, S., Fijak, M., Vijayan, V., Chakraborty, T. & Meinhardt, A., 2015. Differential Activation of Inflammatory Pathways in Testicular Macrophages Provides a Rationale for Their Subdued



- Inflammatory Capacity. *The Journal of Immunology*, 194(11), pp.5455–5464.
- Boockfor, F.R., Wang, D., Lin, T., Nagpal, M.L. & Spangelo, B.L., 1994. Interleukin-6 Secretion from Rat Leydig Cells in Culture. *Endocrinology*, 134(5), pp.3026–3029.
- Bravo, J. & Heath, J.K., 2000. Receptor recognition by gp130 cytokines. *The EMBO Journal*, 19(11), pp.2399–2411.
- Bremner, W.J., Millar, M.R., Sharpe, R.M. & Saunders, P.T., 1994. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology*, 135(3), pp.1227–1234.
- Brinkmann, A.O., Klaasen, P., Kuiper, G.G., van der Korput, J.A., Bolt, J., de Boer, W., Smit, A., Faber, P.W., van Rooij, H.C. & Geurts van Kessel, A., 1989. Structure and function of the androgen receptor. *Urological Research*, 17(2), pp.87–93.
- Bugeon, L. & Dallman, M.J., 2000. Costimulation of T Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162(2), pp.164–168.
- Burgos-Trinidad, M., Youngblood, G.L., Maroto, M.R., Scheller, A., Robins, D.M. & Payne, A.H., 1997. Repression of cAMP-induced expression of the mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase gene (Cyp17) by androgens. *Molecular Endocrinology*, 11(1), pp.87–96.
- Bushnik, T., Cook, J.L., Yuzpe, A.A., Tough, S. & Collins, J., 2012. Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Human Reproduction*, 27(3), pp.738–746.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), pp.169–193.
- Buzek, S.W. & Sanborn, B.M., 1988. Increase in testicular androgen receptor during sexual maturation in the rat. *Biology of Reproduction*, 39(1), pp.39–49.
- Cantrell, M.A., Anderson, D., Cerretti, D.P., Price, V., McKereghan, K., Tushinski, R.J., Mochizuki, D.Y., Larsen, A., Grabstein, K. & Gillis, S., 1985. Cloning, sequence, and expression of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(18), pp.6250–6254.
- De Cesaris, P., Filippini, A., Cervelli, C., Riccioli, A., Muci, S., Starace, G., Stefanini, M. & Ziparo, E., 1992. Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured in vitro: biological effects on lymphocytes. *Biochemical and Biophysical*

- Research Communications*, 186(3), pp.1639–1646.
- Chan, M.C., Mather, J.P., McCray, G. & Lee, W.M., 2000. Identification and regulation of receptor tyrosine kinases Rse and Mer and their ligand Gas6 in testicular somatic cells. *Journal of Andrology*, 21(2), pp.291–302.
- Chang, C., Chen, Y.-T., Yeh, S.-D., Xu, Q., Wang, R.-S., Guillou, F., Lardy, H. & Yeh, S., 2004. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), pp.6876–6881.
- Chapin, R.E., Wine, R.N., Harris, M.W., Borchers, C.H. & Haseman, J.K., 2001. Structure and control of a cell-cell adhesion complex associated with spermiation in rat seminiferous epithelium. *Journal of Andrology*, 22(6), pp.1030–1052.
- Cheng, J., Watkins, S.C. & Walker, W.H., 2007. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in sertoli cells. *Endocrinology*, 148(5), pp.2066–2074.
- Clarke, R., van den Berg, H.W. & Murphy, R.F., 1990. Reduction of the membrane fluidity of human breast cancer cells by tamoxifen and 17 beta-estradiol. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(21), pp.1702–1705.
- Clermont, Y., 1963. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *The American Journal of Anatomy*, 112(3), pp.35–51.
- Corcoran, M.P., Meydani, M., Lichtenstein, A.H., Schaefer, E.J. & Lamon-fava, S., 2011. Sex hormone modulation of proinflammatory cytokine and CRP expression in macrophages from older men and postmenopausal women. *Journal of Endocrinology*, 206(2), pp.217–224.
- Cutolo, S.R., Sulli, A., Capellino, S., Villagio, B., Montagna, P. & Seriolo, B., 2004. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*, 13(9), pp.635–638.
- D'Alessio, A., Riccioli, A., Lauretti, P., Padula, F., Muciaccia, B., De Cesaris, P., Filippini, A., Nagata, S. & Ziparo, E., 2001. Testicular FasL is expressed by sperm cells. *PNAS*, 98(6), pp.3316–3321.
- Datta, J., Palmer, M.J., Tanton, C., Gibson, L.J., Jones, K.G., Macdowall, W., Glasier, A., Sonnenberg, P., Field, N., Mercer, C.H., Johnson, A.M. & Wellings, K., 2016. Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Human*

- Reproduction*, 31(9), pp.2108–2118.
- Davidoff, M.S., Middendorff, R., Mayer, B., DeVente, J., Koesling, D. & Holstein, A.F., 1997. Nitric oxide/cGMP pathway components in the Leydig cells of the human testis. *Cell and Tissue Research*, 287(1), pp.161–170.
- Davila, S., Froeling, F.E.M., Tan, A., Bonnard, C., Boland, G.J., Snippe, H., Hibberd, M.L. & Seielstad, M., 2010. New genetic associations detected in a host response study to hepatitis B vaccine. *Genes and immunity*, 11(3), pp.232–238.
- De, S.K., Chen, H.-L., Pace, J.L., Hunt, J.S., Terranova, P.F. & Enders, G.C., 1993. Expression of Tumor Necrosis Factor-alpha in Mouse Spermatogenic Cells. *Endocrinology*, 133(1), pp.389–396.
- Dejucq, N., Lienard, M., Guillaume, E., Dorval, I. & Jegou, B., 1997. Expression of Interferons-alpha and -gamma in Testicular Interstitial Tissue and Spermatogonia of the Rat. *Endocrinology*, 139(7), pp.3081–3087.
- Diemer, T., Hales, D.B. & Weidner, W., 2003. Immune-endocrine interactions and Leydig cell function: the role of cytokines. *Andrologia*, 35(1), pp.55–63.
- Doncel, G.F., Di Paola, J.A. & Lustig, L., 1989. Sequential study of the histopathology and cellular and humoral immune response during the development of an autoimmune orchitis in Wistar rats. *American Journal of Reproductive Immunology*, 20(2), pp.44–51.
- Duan, R., Link, H. & Xiao, B., 2003. Dehydroepiandrosterone therapy ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis in Lewis rats. *Journal of Clinical Immunology*, 23(3), pp.100–106.
- Duckett, R.J., Hedger, M.P., Robert, I.M. & Wreford, N.G., 1997. The Effect of Gonadotropin-Releasing Hormone Immunization and Recombinant Follicle-Stimulating Hormone on the Leydig Cell and Macrophage Populations of the Adult Rat Testis. *Journal of Andrology*, 18(4), pp.417–423.
- Dym, M. & Fawcett, D.W., 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction*, 3(3), pp.308–26.
- el-Demiry, M.I., Hargreave, T.B., Busuttil, A., Elton, R., James, K. & Chisholm, G.D., 1987. Immunocompetent cells in human testis in health and disease. *Fertility and Sterility*, 48(3), pp.470–479.
- Evers, J.L.H., 2002. Female subfertility. *Lancet*, 360(9327), pp.151–159.

- Falkenstein, E., Norman, A. & Wehling, M., 2000. Mannheim Classification of Nongenomically Initiated (Rapid) Steroid Action(s). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85(5), pp.2072–2075.
- Fawcett, D.W., Neaves, W.B. & Flores, M.N., 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9(5), pp.500–32.
- Ferguson, J. & Scothorne, R.J., 1977. Further studies on the transplantation of isolated pancreatic islets. *Journal of Anatomy*, 124(1), pp.9-20–948.
- Figuroa, F., Davicino, R., Micalizzi, B., Oliveros, L. & Forneris, M., 2012. Macrophage secretions modulate the steroidogenesis of polycystic ovary in rats: Effect of testosterone on macrophage pro-inflammatory cytokines. *Life Sciences*, 90(19–20), pp.733–739.
- Fijak, M., Damm, L.-J., Wenzel, J.-P., Aslani, F., Walecki, M., Wahle, E., Eisel, F., Bhushan, S., Hackstein, H., Baal, N., Schuler, G., Konrad, L., Rafiq, A., O'Hara, L., Smith, L.B. & Meinhardt, A., 2015. Influence of Testosterone on Inflammatory Response in Testicular Cells and Expression of Transcription Factor Foxp3 in T Cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, 74(1), pp.12–25.
- Fijak, M. & Meinhardt, A., 2006. The testis in immune privilege. *Immunological Reviews*, 213(1), pp.1–121.
- Fijak, M., Schneider, E., Klug, J., Bhushan, S., Hackstein, H., Schuler, G., Wygrecka, M., Gromoll, J. & Meinhardt, A., 2011. Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats: evidence for a direct role of testosterone on regulatory T cell expansion. *The Journal of Immunology*, 186(5162–5172), p.9.
- Filippini, A., Tripiciano, A., Palombi, F., Teti, A., Paniccia, R., Stefanini, M. & Ziparo, E., 1993. Rat testicular myoid cells respond to endothelin: Characterization of binding and signal transduction pathway. *Endocrinology*, 133(4), pp.1789–1796.
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W. & Mosmann, T.R., 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of Experimental Medicine*, 170(6), pp.2081–2095.
- Fitzpatrick, F., Lepault, F., Homo-Delarche, F., Bach, J. & M, D., 1991. Influence of castration, alone or combined with thymectomy, on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Endocrinology*, 129(11), pp.1382–1390.

- Fix, C., Jordan, C., Cano, P. & Walker, W.H., 2004. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), pp.10919–10924.
- Fraser, J.D., Straus, D. & Weiss, A., 1993. Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression. *Immunology Today*, 14(7), pp.357–362.
- Freedman, A.S., Freeman, G., Horowitz, J.C., Daley, J., Cells, B., Freedman, A.S., Freeman, G., Horowitz, J.C., Daley, J. & Nadler, L.E.E.M., 1987. B7, A B Cell-Restricted Antigen That Identifies Preactivated B Cells. *The Journal of Immunology*, 139(10), pp.3260–3267.
- Freedman, A.S., Freeman, G.J., Rhyhart, K. & Nadler, L.M., 1991. Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cellular Immunology*, 137(2), pp.429–437.
- Frungieri, M.B., Weidinger, S., Meineke, V., Köhn, F.M. & Mayerhofer, A., 2002. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma : Possible relevance to human fibrotic disorders. *PNAS*, 99(23), pp.15072–15077.
- Furman, D., Hejblum, B.P., Simon, N., Jojic, V., Dekker, C.L., Thiebaut, R., Tibshirani, R.J. & Davis, M.M., 2014. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(2), pp.869–874.
- De Gendt, K., Swinnen, J. V, Saunders, P.T.K., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lecureuil, C., Heyns, W., Carmeliet, P., Guillou, F., Sharpe, R.M. & Verhoeven, G., 2004. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), pp.1327–1332.
- Gerard, N., Syed, V., Bardin, W., Genetet, N. & Jegou, B., 1991. Sertoli cells are the site of interleukin-1 alpha synthesis in rat testis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 82(1), pp.13–16.
- Gerdprasert, O., Bryan, M.K.O., Sebire, K., Kretser, D.M. De & Hedger, M.P., 2002. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-

- stimulating factor in normal and inflamed rat testis. *Molecular Human Reproduction*, 8(6), pp.518–524.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. & Laudet, V., 2006. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), pp.685–704.
- Gilliver, S.C., Ashworth, J.J., Mills, S.J., Hardman, M.J. & Ashcroft, G.S., 2006. Androgens modulate the inflammatory response during acute wound healing. *Journal of Cell Science*, 119(4), pp.722–732.
- Gold, S. & Voskuhl, R., 2009. Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis. *Prog Brain Res*, 175(2), pp.239–251.
- Goluz, T., Boscanin, A., Cvetko, J., Kozina, V., Kosovic, M., Bernat, M.M., Kasum, M., Kastelan, Z. & Jezek, D., 2014. Macrophages and leydig cells in testicular biopsies of azoospermic men. *BioMed Research International*, 2014(3), pp.1–14.
- Gorczyńska, E. & Handelsman, D.J., 1995. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology*, 136(5), pp.2052–2059.
- Gornstein, R. a, Lapp, C. a, Bustos-Valdes, S.M. & Zamorano, P., 1999. Androgens modulate interleukin-6 production by gingival fibroblasts in vitro. *Journal of Periodontology*, 70(6), pp.604–609.
- Griswold, M.D., 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 9(4), pp.411–416.
- Guazzone, V.A., Hollwegs, S., Mardirosian, M., Jacobo, P., Hackstein, H., Wygrecka, M., Schneider, E., Meinhardt, A., Lustig, L. & Fijak, M., 2011. Characterization of dendritic cells in testicular draining lymph nodes in a rat model of experimental autoimmune orchitis. *International Journal of Andrology*, 34(3), pp.276–289.
- Guazzone, V.A., Rival, C., Denduchis, B. & Lustig, L., 2003. Monocyte chemoattractant protein-1 ( MCP-1 / CCL2 ) in experimental autoimmune orchitis. *Journal of Reproductive Immunology*, 60(1), pp.143–157.
- Gunnnett, C. a, Heistad, D.D., Berg, D.J. & Faraci, F.M., 2000. IL-10 deficiency increases superoxide and endothelial dysfunction during inflammation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 279, pp.1555–1562.
- Guo, Z., Benten, W.P.M., Krücken, J. & Wunderlich, F., 2002. Nongenomic testosterone calcium signaling: Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33), pp.29600–29607.
- Haider, A., Kurtz, W., Giltay, E.J., Gooren, L.J. & Saad, F., 2010. Administration of

- testosterone to elderly hypogonadal men with Crohn's disease improves their Crohn's Disease Activity Index: a pilot study. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 2(3), pp.287–292.
- Haider, S., 1988. *Leydig-Zellen. Funktionelle Morphologie und Enzymhistochemie bei Ratte und Mensch.*, Georg Thieme Verlag.
- Haider, S.G., 2004. Cell Biology of Leydig Cells in the Testis. In B. T.-I. R. of Cytology, ed. *International Review of Cytology*. Academic Press, pp. 181–241.
- Hakovirta, H., Syed, V., Jegou, B. & Parvinen, M., 1995. Function of interleukin-6 as an inhibitor of meiotic DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 108(1–2), pp.193–198.
- Hales, D.B., 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*, 57(1–2), pp.3–18.
- Hales, D.B., Diemer, T. & Hales, K.H., 1999. Role of Cytokines in Testicular Function. *Endocrine*, 10(3), pp.201–217.
- Hales, D.B., Xiong, Y. & Tur-Kaspa, I., 1992. The role of cytokines in the regulation of Leydig cell P450c17 gene expression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 43(8), pp.907–914.
- Hardy, M., Zirkin, B. & Ewing, L., 1989. Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology*, 124(2), pp.762–770.
- Haugen, T.B., Landmark, B.F., Josefsen, G.M., Hansson, V. & Hogset, A., 1994. The mature form of interleukin-1a is constitutively expressed in immature male germ cells from rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 105, pp.R19-23.
- Hayes, R., Chalmers, S.A. & Hedger, M.P., 1996. Secretion of Bioactive Interleukin 1 by Rat Testicular Macrophages In Vitro. *Journal of Andrology*, 17(1), pp.41–49.
- He, L., Hedger, M.P., Clements, J.A. & Risbridger, G.P., 1991. Localization of immunoreactive beta-endorphin and adrenocorticotrophic hormone and pro-opiomelanocortin mRNA to rat testicular interstitial tissue macrophages. *Biology of Reproduction*, 45(2), pp.282–9.
- Head, J.R. & Billingham, R.E., 1985. Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential local factors. *Transplantation*, 40(3), pp.269–275.
- Head, J.R., Neaves, W.B. & Billingham, R.E., 1983. Immune privilege in the testis. I. Basic parameters of allograft survival. *Transplantation*, 36(4), pp.423–431.

- Hedger, M.P., 2002. Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *Journal of Reproductive Immunology*, 57(1), pp.19–34.
- Hedger, M.P. & Eddy, E.M., 1986. Monoclonal Antibodies against Rat Leydig Cell Surface Antigens. *Biology of Reproduction*, 35(1), pp.1309–1319.
- Hedger, M.P. & Eddy, E.M., 1987. The heterogeneity of isolated adult rat Leydig cells separated on Percoll density gradients: an immunological, cytochemical, and functional analysis. *Endocrinology*, 121(5), pp.1824–1838.
- Hedger, M.P. & Meinhardt, A., 2003. Cytokines and the immune-testicular axis. *Journal of Reproductive Immunology*, 58(1), pp.1–26.
- Himmel, W., Ittner, E., Kochen, M.M., Michelmann, H.W., Hinney, B., Reuter, M., Kallerhoff, M. & Ringert, R.-H., 1997. Management of involuntary childlessness. *British Journal of General Practice*, 47(415), pp.111–118.
- Huhtaniemi, I., Nikula, H., Lehtonen, E. & Hovatta, O., 1986. Testicular morphology and endocrine function after silica-induced damage of interstitial macrophages. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 5(1), pp.57–62.
- Hussein, M.R., Abou-Deif, E.S., Bedaiwy, M.A., Said, T.M., Mustafa, M.G., Nada, E., Ezat, A. & Agarwal, A., 2005. Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertility and Sterility*, 83(5), pp.1447–1453.
- Hutson, J.C., 2006. Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Experimental Biology and Medicine*, 231(1), pp.1–7.
- Hutson, J.C., 1994. Testicular macrophages. *International Review of Cytology*, 149(3), pp.99–143.
- Iosub, R., Klug, J., Schneider, E., Fröhlich, S., Blumbach, K., Wennemuth, G., Sommerhoff, C.P., Steinhoff, M. & Meinhardt, A., 2006. Development of testicular inflammation in the rat involves activation of proteinase-activated receptor-2. *Journal of Pathology*, 208(5), pp.686–698.
- Jacobo, P., Guazzone, V.A., Jarazo-Dietrich, S., Theas, M.S. & Lustig, L., 2009. Differential changes in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector and regulatory T lymphocyte subsets in the testis of rats undergoing autoimmune orchitis. *Journal of Reproductive Immunology*, 81(1), pp.44–54.
- Jäger, A., Radlanski, R.J. & Gotz, W., 1993. Demonstration of cells of the mononuclear phagocyte lineage in the periodontium following experimental tooth movement in



- the rat. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies ED1 und ED2 on paraffin-embedded tissues. *Histochemistry*, 100(2), pp.161–166.
- Johnston, D.S., Russell, L.D., Friel, P.J. & Griswold, M.D., 2001. Murine Germ Cells Do Not Require Functional Androgen Receptors to Complete Spermatogenesis Following Spermatogonial Stem Cell Transplantation. *Endocrinology*, 142(6), pp.2405–2408.
- Kazutaka, S., Winnall, W.R., Muir, J.A. & Hedger, M.P., 2011. Regulation of Sertoli cell activin A and inhibin B by tumour necrosis factor alpha and interleukin 1alpha: interaction with follicle-stimulating hormone/adenosine 3',5'-cyclic phosphate signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335(2), pp.195–203.
- Kelly, C.K.D., Sellers, D., Woodrofe, M. & Jones, T., 2012. Effect of Testosterone on Inflammatory Markers in the Development of Early Atherogenesis in the Testicular- Feminized Mouse Model. *Endocrine Research*, 38(3), pp.125–138.
- Kern, S. & Maddocks, S., 1995. Indomethacin blocks the immunosuppressive activity of rat testicular macrophages cultured in vitro. *Journal of Reproductive Immunology*, 28(3), pp.189–201.
- Kern, S., Robertson, S. a, Mau, V.J. & Maddocks, S., 1995. Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biology of Reproduction*, 53(6), pp.1407–1416.
- Kerr, J.B., Robertson, D.M. & De Kretser, D.M., 1985. Morphological and functional characterization of interstitial cells from mouse testes fractionated on Percoll density gradients. *Endocrinology*, 116(3), pp.1030–1043.
- Kissick, H.T., Sanda, M.G., Dunn, L.K., Pellegrini, K.L., On, S.T., Noel, J.K. & Arredouani, M.S., 2014. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(27), pp.9887–92.
- Klein, S.L., 2012. Immune cells have sex and so should journal articles. *Endocrinology*, 153(6), pp.2544–2550.
- Knorr, D., Vanha-Perittula, T. & Lipsett, M., 1970. Structure and function of rat testis through pubescence. *Endocrinology*, 86(June), p.1298.
- Krause, W., Weidner, W., Sperling, H., Diemer, T. & Altinkilic, B., 2011. *Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane, Ausgabe 4*, Georg Thieme Verlag.
- de Kretser, D.M., 1997. Male Infertility. *Lancet*, 349(9054), pp.787–790.

- Kretser, D.M. De, Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. & Wreford, N., 1998. Spermatogenesis. *Human Reproduction*, 13(2), pp.1–8.
- Lackie, J.M., 2010. *A Dictionary of Biomedicine*, Oxford University Press.
- Lai, J.-J., Lai, K.-P., Chuang, K.-H., Chang, P., I-Chen Yu, W.-J.L. & Chang, C., 2009. Monocyte/macrophage androgen receptor suppresses cutaneous wound healing in mice by enhancing local TNF- $\alpha$  expression. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(12), pp.3739–3751.
- Lanier, L.L., O'Fallon, S., Somoza, C., Phillips, J.H., Linsley, P.S., Okumura, K., Ito, D. & Azuma, M., 1995. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *Journal of Immunology*, 154(1), pp.97–105.
- Von Ledebur, E.I., Almeida, J.P., Loss, E.S. & Wassermann, G.F., 2002. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K<sup>+</sup> ATP channels. *Hormone and Metabolic Research*, 34(10), pp.550–555.
- Lee, T.-S. & Chau, L.-Y., 2002. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nature Medicine*, 8(3), pp.240–246.
- Leite, L., Luchi, R., Von Ledebur, E.I.C.F., Loss, E.S. & Wassermann, G.F., 1999. Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates 45Ca<sup>2+</sup> uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. *Medical Science Research*, 27(4), pp.25–28.
- Li, N., Wang, T. & Han, D., 2012. Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. *Frontiers in Immunology*, 3(1), pp.1–12.
- Lim, P., Robson, M., Spaliviero, J., McTavish, K.J., Jimenez, M., Zajac, J.D., Handelsman, D.J. & Allan, C.M., 2009. Sertoli cell androgen receptor DNA binding domain is essential for the completion of spermatogenesis. *Endocrinology*, 150(10), pp.4755–4765.
- Liu, L., Wang, L., Zhao, Y., Wang, Y., Wang, Z. & Qiao, Z., 2006. Testosterone attenuates p38 MAPK pathway during Leishmania donovani infection of macrophages. *Parasitology Research*, 99(2), pp.189–193.
- Liu, Y., Liang, W.-B., Gao, L.-B., Pan, X.-M., Chen, T.-Y., Wang, Y.-Y., Xue, H., Zhang, L. & Zhang, L., 2010. CTLA4 and CD86 gene polymorphisms and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Human Immunology*, 71(11), pp.1141–1146.

- Liva, S.M. & Voskuhl, R.R., 2001. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. *Journal of Immunology*, 167(4), pp.2060–2067.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  method. *Methods*, 25(4), pp.402–408.
- Lu, L.-F., Lind, E.F., Gondek, D.C., Bennett, K. a, Gleeson, M.W., Pino-Lagos, K., Scott, Z. a, Coyle, A.J., Reed, J.L., Van Snick, J., Strom, T.B., Zheng, X.X. & Noelle, R.J., 2006. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*, 442(7106), pp.997–1002.
- Lukyanenko, Y.O., Chen, J.J. & Hutson, J.C., 2001. Production of 25-hydroxycholesterol by testicular macrophages and its effects on Leydig cells. *Biology of Reproduction*, 64(3), pp.790–796.
- Lustig, L., Lourtau, L., Perez, R. & Doncel, G.F., 1993. Phenotypic characterization of lymphocytic cell infiltrates into the testes of rats undergoing autoimmune orchitis. *International Journal of Andrology*, 16(4), pp.279–284.
- Lyng, F.M., Jones, G.R. & Rommerts, F.F., 2000. Rapid androgen actions on calcium signaling in rat sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biology of Reproduction*, 63(3), pp.736–47.
- Lyon, M.F., Glenister, P.H. & Lamoreux, M.L., 1975. Normal spermatozoa from androgen-resistant germ cells of chimaeric mice and the role of androgen in spermatogenesis. *Nature*, 258(5536), pp.620–622.
- M. Schumacher, G. Schäfer, A. F. Holstein, H.H., 1978. Rapid isolation of mouse leydig Cells by lentrifugation in percoll density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity. *FEBS Letters*, 91(2), pp.333–338.
- Maekawa, M., Kamimura, K. & Nagano, T., 1996. Peritubular and Function \* Myoid Cells in the Testis : Their Structure. *Archives of Histology and Cytology*, 59(1), pp.1–13.
- Martinez, F.O., Helming, L. & Gordon, S., 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*, 27, pp.451–483.
- McCrohon, J., Death, A., Nakhla, S., Jessup, W., Handelsman, D., Stanley, K. & Clermager, D., 2000. Androgen Receptor Expression Is Greater in Macrophages

- From Male Than From Female Donors - A Sex Difference With Implications for Atherogenesis. *Circulation*, 101(3), pp.224–226.
- McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., de Kretser, D.M., Pratis, K. & Robertson, D.M., 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Progress in Hormone Research*, 57(3), pp.149–179.
- McLennan, I.S., 1996. Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. *Journal of Anatomy*, 188 ( Pt 1(3), pp.17–28.
- Mealy, K., Robinson, B. & Millette, C.F., 1990. Testicular Effects of Tumor Necrosis Factor. *Annals of Surgery*, 211(4), pp.470–475.
- Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C., Bucala, R., Wreford, N., Lan, H., Atkins, R. & Hedger, M., 1998. Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biology of Reproduction*, 59(2), pp.371–378.
- Meinhardt, A. & Schuppe, H.-C., 2003. Immunologie des Hodens. *Reproduktionsmedizin*, 19(5–6), pp.257–266.
- Melaine, N., Liénard, M.O., Guillaume, E., Ruffault, A., Dejucq-Rainsford, N. & Jégou, B., 2003. Production of the antiviral proteins 2'5'oligoadenylate synthetase, PKR and Mx in interstitial cells and spermatogonia. *Journal of Reproductive Immunology*, 59(1), pp.53–60.
- Meniru, G.I., 2014. *Cambridge Guide to Infertility Management and Assisted Reproduction*,
- Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M. V., Ametrano, D., Zannini, M.S., Abbondanza, C. & Auricchio, F., 2000. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *The EMBO Journal*, 19(20), pp.5406–5417.
- Millar, D.G., Garza, K.M., Odermatt, B., Elford, A.R., Ono, N., Li, Z. & Ohashi, P.S., 2003. Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nature Medicine*, 9(12), pp.1469–1476.
- Mital, P., Hinton, B.T. & Dufour, J.M., 2011. The Blood-Testis and Blood-Epididymis

- Barriers Are More than Just Their Tight Junctions. *Biology of Reproduction*, 84(5), pp.851–858.
- Moore, C. & Hutson, J.C., 1994. Physiological Relevance of Tumor Necrosis Factor in Mediating Macrophage-Leydig Cell Interactions. *Endocrinology*, 134(1), pp.63–69.
- Mori, H. & Christensen, a K., 1980. Morphometric Analysis of Leydig Cells in the Normal Rat Testis. *Journal of Cell Biology*, 84(2), pp.340–354.
- Morstyn, G. & Burgess, A.W., 1988. Hemopoietic growth factors: a review. *Cancer research*, 48(20), pp.5624–5637.
- Mosher, W.D. & Pratt, W.F., 1991. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertility and Sterility*, 56(2), pp.192–193.
- Mosser, D.M. & Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Genetics*, 8(12), pp.958–969.
- Nakhla, A.M., Mather, J.P., Janne, O.A. & Bardin, C.W., 1984. Estrogen and androgen receptors in Sertoli, Leydig, myoid, and epithelial cells: effects of time in culture and cell density. *Endocrinology*, 115(1), pp.121–128.
- Nes, W.D., Lukyanenko, Y.O., Jia, Z.H., Quideau, S., Howald, W.N., Pratum, T.K., West, R.R. & Hutson, J.C., 2000. Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. *Endocrinology*, 141(3), pp.953–958.
- Niemi, M., Sharpe, R.M. & Brown, W.R.A., 1986. Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell and Tissue Research*, 243(2), pp.337–344.
- Norata, G.D., Cattaneo, P., Poletti, A. & Catapano, A.L., 2010. The androgen derivative 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol inhibits tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide induced inflammatory response in human endothelial cells and in mice aorta. *Atherosclerosis*, 212(1), pp.100–6.
- Nussinovitch, U. & Shoenfeld, Y., 2012. The role of gender and organ specific autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 11(6), pp.377–385.
- O'Bryan, M.K., Schlatt, S., Gerdprasert, O., Phillips, D.J., de Kretser, D.M. & Hedger, M.P., 2000. Inducible nitric oxide synthase in the rat testis: evidence for potential roles in both normal function and inflammation-mediated infertility. *Biology of Reproduction*, 1293(2), pp.1285–1293.
- O'Bryan, M.K., Schlatt, S., Phillips, D.J., de Kretser, D.M. & Hedger, M.P., 2000.

- Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology*, 141(1), pp.238–246.
- O'Donnell, L., McLachlan, R.I., Wreford, N.G., de Kretser, D.M. & Robertson, D.M., 1996. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction*, 55(4), pp.895–901.
- O'Hara, L. & Smith, L.B., 2012. Androgen receptor signalling in Vascular Endothelial cells is dispensable for spermatogenesis and male fertility. *BMC research notes*, 5(1), p.16.
- Okuda, Y., Bardin, C.W., Hodgskin, L.R. & Morris, P.L., 1995. Interleukins-1 alpha and -1 beta regulate interleukin-6 expression in Leydig and Sertoli cells. *Recent Progress in Hormone Research*, 50(3), pp.367–372.
- Olivares, E.G., Montes, M.J., Oliver, C., Galindo, J. a & Ruiz, C., 1997. Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biology of Reproduction*, 57(3), pp.609–615.
- Ozturk, H., Ozturk, H., Terzi, E.H., Bugdayci, G. & Duran, A., 2014. Interleukin 10 reduces testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Urology*, 83(2), pp.508–514.
- Page, H., 1989. Estimation of the prevalence and incidence of infertility in a population: a pilot study. *Fertility and Sterility*, 51(4), pp.571–577.
- Paul, W.E. & Seder, R.A., 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 76(2), pp.241–251.
- Peach, R.J., Bajorath, J., Naemura, J., Leytze, G., Greene, J., Aruffo, A. & Linsley, P.S., 1995. Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *Journal of Biological Chemistry*, 270(36), pp.21181–21187.
- Pelletier, R.M. & Byers, S.W., 1992. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microscopy Research and Technique*, 20(1), pp.3–33.
- Pergola, C., Rogge, A., Dodt, G., Northoff, H., Weinigel, C., Barz, D., Radmark, O., Sautebin, L. & Werz, O., 2011. Testosterone suppresses phospholipase D, causing sex differences in leukotriene biosynthesis in human monocytes. *FASEB Journal*, 25(10), pp.3377–3387.
- Pöllänen, P. & Niemi, M., 1987. Immunohistochemical identification of macrophages,

- lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *International Journal of Andrology*, 10(1), pp.37–42.
- Pollanen, P., Soder, O. & Parvinen, M., 1989. Interleukin-1 alpha stimulation of spermatogonial proliferation in vivo. *Reproduction, Fertility, and Development*, 1(1), pp.85–87.
- Potashnik, H., Elhija, M.A., Lunenfeld, E., Potashnik, G., Schlatt, S., Nieschlag, E. & Huleihel, M., 2005. Interleukin-6 expression during normal maturation of the mouse testis. *European Cytokine Network*, 16(2), pp.161–165.
- Prins, G.S., Birch, L. & Greene, G.L., 1991. Androgen Receptor Localization in Different Cell Types of the Adult Rat Prostate \*. *Endocrinology*, 129(6), pp.3187–3199.
- Proost, P., Wuyts, A. & van Damme, J., 1996. The role of chemokines in inflammation. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, 26(4), pp.211–223.
- Raburn, D.J., Coquelin, A., Reinhart, A.J. & Hutson, J.C., 1993. Regulation of the macrophage population in postnatal rat testis. *Journal of Reproductive Immunology*, 24(2), pp.139–151.
- Rato, L., Alves, M.G., Socorro, S., Duarte, A.I., Cavaco, J.E. & Oliveira, P.F., 2012. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nature Reviews Urology*, 9(6), pp.330–338.
- Reddy, A.G., Shivaji, S. & Gupta, P.D., 1989. Effect of estradiol on the membrane fluidity of the rat vaginal epithelial cells. *Journal of Steroid Biochemistry*, 33(6), pp.1229–1233.
- Rettew, J., Huet-Hudson, Y. & Marriott, I., 2008. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biology of Reproduction*, 78(3), pp.432–437.
- Riccioli, A., Filippini, A., De Cesaris, P., Barbacci, E., Stefanini, M., Starace, G. & Ziparo, E., 1995. Inflammatory mediators increase surface expression of integrin ligands, adhesion to lymphocytes, and secretion of interleukin 6 in mouse Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13), pp.5808–5812.
- Rival, C., Guazzone, V.A., von Wulffen, W., Hackstein, H., Schneider, E., Lustig, L., Meinhardt, A. & Fijak, M., 2007. Expression of co-stimulatory molecules, chemokine receptors and proinflammatory cytokines in dendritic cells from normal

- and chronically inflamed rat testis. *Molecular Human Reproduction*, 13(12), pp.853–861.
- Rival, C., Lustig, L., Iosub, R., Guazzone, V.A., Schneider, E., Meinhardt, A. & Fijak, M., 2006. Identification of a dendritic cell population in normal testis and in chronically inflamed testis of rats with autoimmune orchitis. *Cell and Tissue Research*, 324(2), pp.311–318.
- Rival, C., Theas, M., Suescun, M., Jacobo, P., Guazzone, V., Rooijen, N. va & Lustig, L., 2008. Functional and phenotypic characteristics of testicular macrophages in experimental autoimmune orchitis. *The Journal of Pathology*, 215(3), pp.108–117.
- Rubenstein, M., Shaw, M., Targonski, P., McKiel, C.F., Dubin, A. & Guinan, P., 1991. GM-CSF restoration of a differentiated (growth factor-regulated) phenotype in an anaplastic tumor. *Urological Research*, 19(5), pp.309–312.
- Russell, J.J. & Lindenbaum, A., 1979. One-year study of nonuniformly distributed plutonium in mouse testis as related to spermatogonial irradiation. *Health Physics*, 36(2), pp.153–157.
- Sakanashi, Y., Takeya, M., Yoshimura, T., Feng, L., Morioka, T. & Takahashi, K., 1994. Kinetics of macrophage subpopulations and expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in bleomycin-induced lung injury of rats studied by a novel monoclonal antibody against rat MCP-1. *Journal of Leukocyte Biology*, 56(6), pp.741–750.
- Sar, M., Lubahn, D.B., French, F.S. & Wilson, E.M., 1990. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology*, 127(6), pp.3180–3186.
- Schaufele, F., Carbonell, X., Guerbado, M., Borngraeber, S., Chapman, M.S., Ma, A.A.K., Miner, J.N. & Diamond, M.I., 2005. The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28), pp.9802–9807.
- Schefe, J.H., Lehmann, K.E., Buschmann, I.R., Unger, T. & Funke-Kaiser, H., 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. *Journal of Molecular Medicine*, 84(11), pp.901–910.
- Schell, C., Albrecht, M., Mayer, C., Schwarzer, J.U., Frungieri, M.B. & Mayerhofer,



- A., 2008. Exploring Human Testicular Peritubular Cells: Identification of Secretory Products and Regulation by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Endocrinology*, 149(4), pp.1678–1686.
- Schlatt, S., de Kretser, D.M. & Hedger, M.P., 1999. Mitosis of resident macrophages in the adult rat testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116(2), pp.223–228.
- Schuppe, H.-C., Pilatz, A., Hossain, H., Meinhardt, A., Bergmann, M., Haidl, G. & Weidner, W., 2010. Orchitis and male infertility. *Der Urologe. Ausg. A*, 49(5), pp.629–635.
- Schuppe, H.C., Meinhardt, A., Allam, J.P., Bergmann, M., Weidner, W. & Haidl, G., 2008. Chronic orchitis: A neglected cause of male infertility? *Andrologia*, 40(2), pp.84–91.
- Scott, H.M., Hutchison, G.R., Mahood, I.K., Hallmark, N., Welsh, M., De Gendt, K., Verhoeven, G., O'Shaughnessy, P. & Sharpe, R.M., 2007. Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. *Endocrinology*, 148(5), pp.2027–2036.
- Selawry, H.P. & Cameron, D.F., 1993. Sertoli cell-enriched fractions in successful islet cell transplantation. *Cell Transplantation*, 2(2), pp.123–129.
- Setchell, B.P., 1990. The testis and tissue transplantation: historical aspects. *Journal of Reproductive Immunology*, 18(1), pp.1–8.
- Shang, Y., Myers, M. & Brown, M., 2002. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Molecular Cell*, 9(3), pp.601–610.
- Shihan, M., Buldan, A. & Scheiner-Bobis, G., 2014. Non-classical testosterone signaling is mediated by a G-protein-coupled receptor interacting with Gnalpha11. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(6), pp.1172–1181.
- Shivaji, S. & Jagannadham, M. V, 1992. Steroid-induced perturbations of membranes and its relevance to sperm acrosome reaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1108(1), pp.99–109.
- Shupe, J., Cheng, J., Puri, P., Kostereva, N. & Walker, W.H., 2011. Regulation of Sertoli-germ cell adhesion and sperm release by FSH and nonclassical testosterone signaling. *Molecular Endocrinology*, 25(2), pp.238–252.
- Smith, L.B. & Walker, W.H., 2014. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 30(2), pp.2–13.
- Soder, O., Syed, V., Callard, G. V, Toppari, J., Pollanen, P., Parvinen, M., Froya, B. & Ritzen, E.M., 1991. Production and secretion of an interleukin-1-like factor is

- stage-dependent and correlates with spermatogonial DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium. *International Journal of Andrology*, 14(3), pp.223–231.
- Sonoda, K.H., Matsuzaki, G., Nomura, A., Yamada, H., Hamano, S., Nakamura, T., Mukasa, A. & Nomoto, K., 1997. Macrophages activated by *Listeria monocytogenes* induce organ-specific autoimmunity. *Immunology*, 92(2), pp.274–283.
- Stéphan, J.P., Syed, V. & Jégou, B., 1997. Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 134(2), pp.109–18.
- Suarez-Pinzon, W., Korbitt, G.S., Power, R., Hooton, J., Rajotte, R. V & Rabinovitch, A., 2000. Testicular Sertoli Cells Protect Islet Beta-Cells From Autoimmune Destruction in NOD Mice by a Transforming Growth Factor-Beta1–Dependent Mechanism. *Diabetes*, 49(11), pp.1810–1818.
- Suescun, M.O., Calandra, R.S. & Lustig, L., 2000. Effect of Testicular Macrophage Conditioned Media from Rats with Autoimmune Orchitis on Leydig Cell Function. *American Journal of Reproductive Immunology*, 43(2), pp.116–123.
- Sun, X.R., Hedger, M.P. & Risbridger, G.P., 1993. The effect of testicular macrophages and interleukin-1 on testosterone production by purified adult rat Leydig cells cultured under in vitro maintenance conditions. *Endocrinology*, 132(1), pp.186–192.
- Syed, V., Gerard, N., Kaipia, A., Bardin, C.W., Parvinen, M. & Jegou, B., 1993. Identification, ontogeny, and regulation of an interleukin-6-like factor in the rat seminiferous tubule. *Endocrinology*, 132(1), pp.293–299.
- Syed, V., Stephan, J.P., Gerard, N., Legrand, A., Parvinen, M., Bardin, C.W. & Jegou, B., 1995. Residual bodies activate Sertoli cell interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) release, which triggers IL-6 production by an autocrine mechanism, through the lipoxygenase pathway. *Endocrinology*, 136(7), pp.3070–3078.
- Taylor, S.C., Berkelman, T., Yadav, G. & Hammond, M., 2013. A defined methodology for reliable quantification of western blot data. *Molecular Biotechnology*, 55(3), pp.217–226.
- Templeton, A., Fraser, C. & Thompson, B., 1990. The epidemiology of infertility in Aberdeen. *BMJ (Clinical research ed.)*, 301(6744), pp.148–152.
- Terayama, H., Yoshimoto, T., Hirai, S., Naito, M., Qu, N., Hatayama, N., Hayashi, S., Mitobe, K., Furusawa, J.I., Mizoguchi, I., Kezuka, T., Goto, H., Suyama, K.,

- Moriyama, H., Sakabe, K. & Itoh, M., 2014. Contribution of IL-12/IL-35 common subunit p35 to maintaining the testicular immune privilege. *PLOS ONE*, 9(4), pp.96–104.
- Theas, M.S., Rival, C., Jarazo-Dietrich, S., Jacobo, P. V, Guazzone, V. a & Lustig, L., 2008. Tumour necrosis factor-alpha released by testicular macrophages induces apoptosis of germ cells in autoimmune orchitis. *Human Reproduction*, 23(8), pp.1865–72.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., Borman, B. De & Coumans, B., 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75(4), pp.291–295.
- Thoma, M.E., McLain, A.C., Louis, J.F., Rosalind, B., Trumble, A.C., Sundaram, R. & Buck Louis, G.M., 2014. The prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertility and Sterility*, 99(5), pp.1324–1331.
- Tichopad, A., Didier, A. & Pfaffl, M.W., 2004. Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Molecular and Cellular Probes*, 18(1), pp.45–50.
- Tilg, H., Dinarello, C.A. & Mier, J.W., 1997. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunology Today*, 18(9), pp.428–432.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), pp.4350–4354.
- Tsai, M.-Y., Yeh, S.-D., Wang, R.-S., Yeh, S., Zhang, C., Lin, H.-Y., Tzeng, C.-R. & Chang, C., 2006. Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), pp.18975–18980.
- Tung, K.S., Yule, T.D., Mahi-Brown, C.A. & Listrom, M.B., 1987. Distribution of histopathology and Ia positive cells in actively induced and passively transferred experimental autoimmune orchitis. *Journal of Immunology*, 138(3), pp.752–759.
- Tung, K.S.K., Harakal, J., Qiao, H., Rival, C., Li, J.C.H., Paul, A.G.A., Wheeler, K., Pramoonjago, P., Grafer, C.M., Sun, W., Sampson, R.D., Wong, E.W.P., Reddi, P.P., Deshmukh, U.S., Hardy, D.M., Tang, H., Cheng, C.Y. & Goldberg, E., 2017.

- Egress of sperm autoantigen from seminiferous tubules maintains systemic tolerance. *Journal of Clinical Investigation*, 127(3), pp.1046–1060.
- Verhoeven, G. & Cailleau, J., 1988a. Follicle-stimulating hormone and androgens increase the concentration of the androgen receptor in Sertoli cells. *Endocrinology*, 122(4), pp.1541–1550.
- Verhoeven, G. & Cailleau, J., 1988b. Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that inhibits induction of aromatase activity in Sertoli cells. *Endocrinology*, 123(4), pp.2100–2110.
- Vilanova, L.T., Rauch, M.C., Mansilla, A., Zambrano, A., Brito, M., Werner, E., Alfaro, V., Cox, J.F. & Concha, I.I., 2003. Expression of granulocyte–macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in male germ cells: GM-CSF enhances sperm motility. *Theriogenology*, 60(6), pp.1083–1095.
- Vilček, J. & Thomson, A., 1998. The cytokines: an overview. In *The Cytokine Handbook*. Academic Press, San Diego, pp. 1–20.
- Vornberger, W., Prins, G., Musto, N.A. & Suarez-quian, C.A., 1994. Androgen Receptor Distribution in Rat Testis: Implications for Androgen Regulation of Spermatogenesis. *Endocrinology*, 134(5), pp.2307–2316.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G. & de Vries, J.E., 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 174(5), pp.1209–20.
- de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M.G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H. & de Vries, J.E., 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 174(4), pp.915–24.
- Walker, W.H., 2011. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis*, 1(2), pp.116–120.
- Wang, J., Wreford, N.G., Lan, H.Y., Atkins, R. & Hedger, M.P., 1994. Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. *Biology of Reproduction*, 51(3), pp.551–561.

- Wang, M., Fijak, M., Hossain, H., Markmann, M., Nüsing, R.M., Lochnit, G., Hartmann, M.F., Wudy, S.A., Zhang, L., Gu, H., Konrad, L., Chakraborty, T., Meinhardt, A. & Bhushan, S., 2017. Characterization of the Micro-Environment of the Testis that Shapes the Phenotype and Function of Testicular Macrophages. *The Journal of Immunology*, 198(9), pp.1–14.
- Wang, R.S., Yeh, S., Tzeng, C.R. & Chang, C., 2009. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: Lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 30(2), pp.119–132.
- Weidner, W., Krause, W. & Ludwig, M., 1999. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Human Reproduction*, 5(5), pp.421–432.
- Welsh, M., Moffat, L., Belling, K., de Franca, L.R., Segatelli, T.M., Saunders, P.T.K., Sharpe, R.M. & Smith, L.B., 2012. Androgen receptor signalling in peritubular myoid cells is essential for normal differentiation and function of adult Leydig cells. *International journal of andrology*, 35(1), pp.25–40.
- Wheeler, K., Tardif, S., Rival, C., Luu, B., Bui, E., Del Rio, R., Teuscher, C., Sparwasser, T., Hardy, D. & Tung, K.S., 2011. Regulatory T cells control tolerogenic versus autoimmune response to sperm in vasectomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), pp.7511–7516.
- Wiles, T.J., Kulesus, R.R. & Mulvey, M.A., 2009. Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic Escherichia coli. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1), pp.11–19.
- Winnall, W.R. & Hedger, M.P., 2013. Phenotypic and functional heterogeneity of the testicular macrophage population: A new regulatory model. *Journal of Reproductive Immunology*, 97(2), pp.147–158.
- Winnall, W.R., Muir, J.A. & Hedger, M.P., 2011. Rat resident testicular macrophages have an alternatively activated phenotype and constitutively produce interleukin-10 in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(1), pp.133–143.
- Wistuba, J., 2003. Organization of Seminiferous Epithelium in Primates: Relationship to Spermatogenic Efficiency, Phylogeny, and Mating System. *Biology of Reproduction*, 69(2), pp.582–591.
- Wunderlich, F., Benten, W.P.M., Lieberherr, M., Guo, Z., Stamm, O., Wrehlke, C.,

- Sekeris, C.E. & Mossmann, H., 2002. Testosterone signaling in T cells and macrophages. *Steroids*, 67(6), pp.535–538.
- Wyatt, C.R., Law, L., Magnuson, J.A., Griswold, M.D. & Magnuson, N.S., 1988. Suppression of lymphocyte proliferation by proteins secreted by cultured Sertoli cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 14(1), pp.27–40.
- Xiong, Y. & Hales, D.B., 1997. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 on 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-->delta 4 isomerase expression in mouse Leydig cells. *Endocrine*, 7(3), pp.295–301.
- Xiong, Y. & Hales, D.B., 1993. Expression, Regulation, and Production of Tumor Necrosis Factor-alpha in Mouse Testicular Interstitial Macrophages in Vitro. *Endocrinology*, 133(6), pp.2568–2573.
- Yee, J.B. & Hutson, J.C., 1983. Testicular macrophages: isolation, characterization and hormonal responsiveness. *Biology of Reproduction*, 29(3001), pp.1319–1326.
- Yule, D., 1993. Experimental Autoimmune Orchitis Induced by Testis and Sperm Antigen-Specific T Cell Clones: An Important Pathogenic Cytokine is Tumor Necrosis Factor\*. *Endocrinology*, 133(3), pp.1098–1107.
- Zhang, J., Wong, C.H., Xia, W., Mruk, D.D., Lee, N.P.Y., Lee, W.M. & Cheng, C.Y., 2005. Regulation of sertoli-germ cell adherens junction dynamics via changes in protein-protein interactions of the N-cadherin-beta-catenin protein complex which are possibly mediated by c-Src and myotubularin-related protein 2: An in vivo study using an androg. *Endocrinology*, 146(3), pp.1268–1284.
- Zhao, S., Zhu, W., Xue, S. & Han, D., 2014. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cellular & Molecular immunology*, 11(5), pp.428–437.
- Zhou, Q., Nie, R., Prins, G.S., Saunders, P.T.K., Katzenellenbogen, B.S. & Hess, R. a., 2002. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *Journal of Andrology*, 23(6), pp.870–881.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. & Vitzthum, F., 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32(12), pp.103–5.
- Zirkin, B.R., Santulli, R., Awoniyi, C.A. & Ewing, L.L., 1989. Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology*, 124(6), pp.3043–3049.



## 9. Anhang

---

### 9.1. Publikationsverzeichnis

Fijak, M., Damm, L.-J., **Wenzel, J.-P.**, Aslani, F., Walecki, M., Wahle, E., Eisel, F., Bhushan, S., Hackstein, H., Baal, N., Schuler, G., Konrad, L., Rafiq, A., O'Hara, L., Smith, L. B., Meinhardt, A. (2015). Influence of Testosterone on Inflammatory Response in Testicular Cells and Expression of Transcription Factor Foxp3 in T Cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, 74(1), pp. 12-25



## 9.2. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### 9.3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich all denen danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Andreas Meinhardt danke ich, für die Möglichkeit, ein Teil seiner Forschungsgruppe zu werden und unter seiner Leitung diese Arbeit schreiben zu dürfen. Ihr wissenschaftlicher Rat, Ihr offenes Büro, Ihre Hilfestellungen und Ihre Entschlossenheit haben wesentlich zur Entstehung der vorliegenden Arbeit geführt.

Frau Dr. M. Fijak danke ich für Ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihr Verständnis bei jedweder Frage. Ihre umfangreiche und kompetente Betreuung vom Anfang bis zum Ende der Arbeit hat mich stets begleitet, meinen Horizont erweitert und mich motiviert, am Ball zu bleiben.

Ein großer Dank geht auch an Frau Dr. F. Aslani, die mich in den Laboralltag einführte und die notwendigen Techniken lehrte. Mit viel Geduld hat sie mich nicht nur am Anfang, sondern auch im Verlauf begleitet und mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Auch bei dem Team der AG Meinhardt, Dr. J. Klug, Dr. S. Bushan, Dr. M. Walecki, Dr. F. Eisel, Dr. Z. Zhang, Dr. V. Michel, Suada Fröhlich und Vera Stadler möchte ich mich ganz herzlich für all die Hilfestellungen, die liebe Aufnahme ins Team und jegliche Ratschläge auf dem Weg zur Vollendung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Dr. A. Rafiq möchte ich für seine Hilfe bei der Umsetzung der intrazellulären Calcium Messungen und seine vielen klugen Ratschläge danken.

Bei Bettine Wyszomirski und Prof. Dr. Ulrich Kautz möchte tatkräftige ich mich für ihre Unterstützung bedanken.

Ebenso möchte ich meiner geliebten Frau Ulla-Lotte Wenzel danken, die stets Verständnis für all die Stunden hatte, die ich in dieses Projekt stecken musste und mich immer wieder ermutigte, nicht aufzugeben. Ohne Deine Unterstützung, Liebe, Hingabe und Hilfe wäre es nie zur Fertigstellung dieser Arbeit gekommen.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, Michael und Ute Wenzel, ohne die ich nie bis hier gekommen wäre. All die Liebe und Zeit, die Aufopferung und Fürsorge, die sie in mich investiert haben, sind der Grundstein aller persönlicher und wissenschaftlicher Errungenschaften.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**